

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-37195

(P2000-37195A)

(43) 公開日 平成12年2月8日 (2000. 2. 8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
9/64		9/64	Z
A 6 1 K 31/00	6 0 7	A 6 1 K 31/00	6 0 7 A
38/46		C 0 7 K 14/81	
C 0 7 K 14/81		A 6 1 K 37/54	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-209809
 (62) 分割の表示 特願平2-505024の分割
 (22) 出願日 平成2年3月1日 (1990. 3. 1)

(31) 優先権主張番号 3 1 9 2 1 2
 (32) 優先日 平成1年3月6日 (1989. 3. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 4 3 4 7 4 8
 (32) 優先日 平成1年11月13日 (1989. 11. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 597055696
 ザ・ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国テキサス州オースティン・ウエストセブンスストリート201

(72) 発明者 ジョセフ・エフ・サムブルツク
 アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・アービンシモンズドライブ4320

(74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 t-P Aのセリンプロテアーゼインヒターによる阻害に対して抵抗性のt-P A変異体であって、296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-P Aであるt-P A変異体及びそれをコードする遺伝子。

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-37195

(P2000-37195A)

(43) 公開日 平成12年2月8日 (2000.2.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
9/64		9/64	Z
// A 6 1 K 31/00	6 0 7	A 6 1 K 31/00	6 0 7 A
38/46		C 0 7 K 14/81	
C 0 7 K 14/81		A 6 1 K 37/54	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-209809
 (62) 分割の表示 特願平2-505024の分割
 (22) 出願日 平成2年3月1日 (1990.3.1)
 (31) 優先権主張番号 3 1 9 2 1 2
 (32) 優先日 平成1年3月6日 (1989.3.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 4 3 4 7 4 8
 (32) 優先日 平成1年11月13日 (1989.11.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 597055696
 ザ・ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国テキサス州オースティン・ウエストセブンスストリート201
 (72) 発明者 ジョセフ・エフ・サムブルツク
 アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・アービンシモンズドライブ4320
 (74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 t-P Aのセリンプロテアーゼインヒターによる阻害に対して抵抗性のt-P A変異体であって、296〜302位置のアミノ酸が欠失しているt-P Aであるt-P A変異体及びそれをコードする遺伝子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体であって、296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAであるt-PA変異体

【請求項2】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体であって、296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAであるt-PA変異体をコードしている遺伝子

【請求項3】 (A) 296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAをコードしている遺伝子を含んで成るDNAにより発現転写された宿主細胞を培養し、そして

(B) 生ずる変異体を単離することを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を得る方法

【請求項4】 (A) 296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAを得、そして

(B) t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性変異体をスクリーニングする、ことを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を提供する方法

【請求項5】 t-PAの296～302位置のアミノ酸を欠失させることを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を得る方法

【請求項6】 A1) 特許番号67895を有し且つ296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAをコードするpSVT7 (R1) のt-PA (Del 296-302) 【DH-1】

【請求項7】 296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAをコードするプラズミドpSVT7 (R1) のt-PA (Del 296-302)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は血栓溶解剤による阻害に対して抵抗性であるキモトリプシン・スーパーファミリーのセリンプロテアーゼ変異株、及びそれをコードする遺伝子に関する。本発明は又、本発明のセリンプロテアーゼ変異株を阻害するセリンプロテアーゼインヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子に関する。セリンプロテアーゼ変異株、及びセリンプロテアーゼインヒビター変異株は、例えば薬剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】1. セリンプロテアーゼ
セリンプロテアーゼ (E. C. 3. 4. 21) は、バッチ結合分裂における溶媒試験としてセリンを使用するエリトシチダーゼのサブクラスである (Bar-

rett, A. J., 5: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁; 及びHartley, B. S., Ann Rev Biochem., 29: 45-72 (1960))

【0003】セリンプロテアーゼは文献により周知であり、セリンプロテアーゼの2つのスーパーファミリー、すなわちキモトリプシン・スーパーファミリー、及びストリプティミセス・キモトリプシン・スーパーファミリーはこれまでに観察されていた (Barrett, A. J., 於 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986)), 及びJames, M. N. G., 於 Proteolysis and Physiological Regulation, 出版 Robbans, D. W. 等, Academic Press, New York, 125-142頁 (1976))。

【0004】キモトリプシン・スーパーファミリーのセリンプロテアーゼの例には組織型プラスミンogen活性化因子 (下文では"t-PA")、トリプシン、トリプシン様プロテアーゼ、キモトリプシン、トラスミン、エラスターゼ、コロキナーゼ (又は溶一型プラスミンogen活性化因子 (下文では"u-PA")), アクロニン、活性化プロテインC、C1エステラーゼ、カサプシンG、チマーゼ、ならびにカリクレイン、トロンピン及び因子VIIa, IXa, Xa, XIa及びXIIaを含む血液凝固カスケードのプロテアーゼが含まれる (Barrett, A. J., 於 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986)), Strassburger, W. 等, FEBS Lett., 157: 219-223 (1983); Dayhoff, M. O., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5巻, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland (1972); 及びRosenberg, R. D. 等, Hosp. Pract., 21: 131-137 (1986))。t-PA、プラスミン、u-PA、及び血液凝固カスケードのプロテアーゼを含むキモトリプシン・スーパーファミリーのセリンプロテアーゼのいくつかは巨大分子であり、セリンプロテアーゼ触媒ドメインの他にその活性の調節に一部関与する構造ドメインを含む (Barrett, A. J., 於 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986)), Gerard, R. D. 等, Mol. Biol. Med., 3: 449-457 (1

等, Ann. Rev. Biochem., 49:593-626 (1980); Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barret, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986); 及び Po-

nte, P. 等, Nature, 331:525-527 (1988)), セリン プロテアーゼ、及びそれらと同起源のBPTIファミリー阻害剤の例を下表1に挙げる。

【0011】

表1

セリン プロテアーゼ	同起源BPTI阻害剤
トリプシン	BPTI
	ヘビ毒インヒビター
	インターアルファ インヒビター
(未知)	A4アミロイド前駆体A4695
	プロセリン-ネグリン-11

B. Kazalファミリー

Kazalファミリーに属するセリン プロテアーゼインヒビターには、古い臓分阻害剤、オボムコイド、及び精製アクロニンインヒビターが含まれる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49:593-626 (1980); Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barret, A. J. 等, Else-

vier, Amsterdam, 301-336頁 (1986); 及びLaskowski, M. 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 41:545-553 (1976)), セリン プロテアーゼ、及びそれらと同起源のKazalファミリー阻害剤の例を下表11に挙げる。

【0012】

表11

セリン プロテアーゼ	同起源Kazal阻害剤
トリプシン	古い臓分阻害剤
	オボムコイド
	精製アクロニンインヒビター
アクロニン	オボムコイド
	精製アクロニンインヒビター

C. ストレプトミセス (スブチリ) シン インヒビター
ストレプトミセス (スブチリ) シン インヒビターファミリーに属するセリンプロテアーゼインヒビターにはストレプトミセス アルボグリスセオルスから得られる阻害剤、及びブラスミナストレプチンが含まれる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem.

49:593-626 (1980))。セリンプロテアーゼ及びそれらと同起源のストレプトミセススブチリシンのクラスの阻害剤の例を下表111に挙げる。

【0013】

表111

セリン プロテアーゼ	同起源SSIインヒビター
スブチリシン (BPN)	ストレプトミセス アルボグリスセオルス
	インヒビター
ブラスミン	ブラスミナストレプチン
トリプシン	ブラスミナストレプチン

D. セルビンファミリー

セルビンファミリーに属するセリン プロテアーゼインヒビターにはブラスミンが活性化因子インヒビターPAI-1, PAI-2及びPAI-3, C1エステラーゼインヒビター、アルファ-2-アンチトリプシン、コントリン、アルファ-1-アンチトリプシン、アンチトリプシン-111、プロテアーゼネグリン-1、アルファ-1-アンチキモトリプシン、プロテアーゼCインヒビター、ヘビ毒補因子-11、及び成長ホルモ調節タンパク質が含まれる (Carrel, R. W. 等, Cold Spring Harbor

Symp. Quant. Biol., 52:527-535 (1987); Sommer, J. 等, Biochem., 26:6407-6410 (1987); Suzuki, K. 等, J. Biol. Chem., 262:611-616 (1987); 及びStump, D. C. 等, J. Biol. Chem., 261:12759-12766 (1986))。

【0014】セルビンによるセリン プロテアーゼの阻害はTravis, J. 等, Ann. Rev. Biochem., 52:655-709 (1983); Carrel, R. W. 等, Trends Biochem. Sc

1, 10:20-24 (1985); Sprengers, E. D. 等, Blood, 69:381-387 (1987), 及び Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam (1986) で調査

されている。

【0015】セリン・プロテアーゼ、及びそれらと同起源のセルリン・インヒビターの例を下表IVに挙げる。

【0016】

表IV

セリン・プロテアーゼ	同起源セルリン・インヒビター
活性化プロテインC	プロテインC阻害剤
	PAI-1
C1エステラーゼ	C1エステラーゼ・インヒビター
カテプシンG	アルファ-1-アンチトリプシン
	アルファ-1-アンチキモトリプシン
キマーゼ	アルファ-1-アンチキモトリプシン
キモトリプシン	アルファ-1-アンチキモトリプシン
	アルファ-2-アンチトリプシン
	アンチトリプシン
凝固因子 (VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa)	アンチトリプシン (III)
エラスターゼ	C1エステラーゼ・インヒビター
カリクレイン	アルファ-1-アンチトリプシン
	C1エステラーゼ・インヒビター
	アルファ-1-アンチトリプシン
トリプシン	アルファ-2-アンチトリプシン
トリプシン	アンチトリプシン (III)
ト-PA	ヘパリン・補因子 (I)
	PAI-1, PAI-2,
	PAI-3
トリプシン	アルファ-1-アンチトリプシン
	成長因子・調節蛋白質
トリプシン様・プロテアーゼ	プロテアーゼ・ネグリン (I)
u-PA	PAI-1, PAI-2,
	PAI-3

E. 大豆トリプシン・インヒビター・ファミリー
大豆から精製した大豆トリプシン・インヒビター・ファミリーの唯一の例は配列が決定されている。牛すい臓トリプシンとのその複合体が研究されている (Sweet, R. M. 等, Biochem., 13:4214-4228 (1974))。

【0017】F. ポテト・インヒビター・ファミリー
ポテト・インヒビター・ファミリーに属するセリン・プロ

テアーゼ・インヒビターには、じゃがいも、大麦、及びひるからの阻害剤が含まれる (Read, R. J. 等, 前掲: Proteinase Inhibitor, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。セリン・プロテアーゼ、及びそれらのポテト・インヒビターの例を下表Vに挙げる。

【0018】

表V

セリン・プロテアーゼ	ポテト・インヒビター
キモトリプシン	大麦キモトリプシン・インヒビター
スベチリン・プロボ	大麦キモトリプシン・インヒビター
スベチリン・カルスベルグ	ひる阻害剤・エゲリン

G. ボーマン・バーク・インヒビター
ボーマン・バーク・インヒビター・ファミリーに属するセリン・プロテアーゼ・インヒビターはマメからの相同タンパク質を含む (Laskowski, M. 等, Ann Rev. Biochem., 49:593-626

(1980))。セリン・プロテアーゼ、及びそれらのボーマン・バーク・インヒビターの例を下表VIに挙げる。

【0019】

表VI

セリン・プロテアーゼ
トリプシン
エラスターゼ
キモトリプシン

ボーマン・ブーク・インヒビター
あおいま阻害剤・I V
カーデン・ビン阻害剤
アズキマ阻害剤・I I

I I I。セリン・プロテアーゼ・インヒビター複合体すべてのファミリーからのセリン・プロテアーゼ・インヒビターはそれらと同起源のセリン・プロテアーゼと安定な1:1複合体を形成する。これらの複合体の解離は非常に遅い(数時間から数日)(Laskowski, M. 等, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 593-626 (1980)), 及びLevin, E. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 6804-6808 (1983))。セリンを阻害するすべてのセリン・プロテアーゼ・インヒビターの場合、解離生成物は完全な阻害剤、及び分裂した阻害剤分子の混合物である。他方、セリン・プロテアーゼ・インヒビター複合体は解離により分裂した阻害剤分子のみを生ずるようなので、セリンは他のセリン・プロテアーゼ・インヒビターと異なる機構を使用すると思われる。

【0020】トリプシン-BPTI、キモトリプシン-カズミドイン・インヒビター、キモトリプシン-ドクト・インヒビター、及びストリプティン・グロブリン・ファクトリド・セリン・プロテアーゼ阻害剤複合体に関する構造データが得られる(Read, R. J. 等, 於 *Proteinase Inhibitors*, 出版: Barendse, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁(1986))。これらの構造を調べると、阻害剤の膜内な配列にもかかわらず、各阻害剤とその同起源のセリン・プロテアーゼ間の特異的な相互作用において顕著な類似性があることが明らかになる。本発明においてこの構造の類似性により、結晶構造が得られない場合でも阻害剤及びそれと同起源のセリン・プロテアーゼの間で起る塩酸相互作用を予測することができるということを予言した。

【0021】上記の議論の通り阻害剤は活性中心を含み、それがセリン・プロテアーゼの活性部位に対する枯花基質となる。活性中心のP₁-P₂残基(例えばPAI-1の場合Arg₃₄₆-Met₃₄₇)間のパイプ結合への攻撃によりセリン・プロテアーゼからの生成物の正常で迅速な解離が起こらず、おそらくプロテアーゼの活性部位のセリン及び阻害剤のP₁残基の間の共有結合の形成により安定なセリン・プロテアーゼ・インヒビター複合体が確立される(Laskowski, M. 等, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 593-626 (1980))。この機構は、PAI-1などの阻害剤の活性中心がセリン・プロテアーゼの活性部位に緊密に、正確に適合しなければならないことを示す。しかしこれまでPAI-1、それと同起源のセリン・プロテアー

ゼ、t-PA、又はt-PA/PAI-1複合体についてのX-線結晶学的データはない。従ってこのタンパク質の対力間の相互作用の正確な性質は未知である。他のタンパク質、又はセリン・プロテアーゼ複合体の構造についての情報も同様に不足している。

I V。セリン・プロテアーゼの利用
キモトリプシン・カズミドイン・インヒビター-特に重要なセリン・プロテアーゼはt-PAである。t-PAは直接作用して血栓(血栓)を溶解するわけではないが、心筋梗塞、肺塞栓症、及び重症の静脈血栓の治療に、冠動脈内では静脈内投与によって現在使用されている。t-PAはプラスミン・ゲンのArg₅₀₆及びVal₅₆₁間のパイプ結合の分裂を促進し(Kobblers, K. C. 等, *J. Biol. Chem.*, **242**: 2333-2342 (1967))。それにより不活性化フィブリンを強力であるが非特異的なプロテアーゼ、プラスミンに変換し、それが血栓のフィブリンの網目を分解する(Bachmann, E. 等, *Semin. Throm. Hemostasis*, **43**: 77-89 (1984))。Gerard, R. D. 等, *Mol. Biol. Med.*, **3**: 449-557 (1986)、及びVerstraete, M. 等, *Blood*, **67**: 1529-1541 (1986))。

【0022】t-PAは必ずしも全身的にフィブリン・ゲルを枯花させることなく局所的なフィブリン溶解現象を起こす。これはt-PAがフィブリンに直接結合してフィブリン-t-PA複合体を形成することができ、そのプラスミン・ゲルに対する親和力が約500倍に増加するからである(Ranby, M. 等, *Biochem. Biophys. Acta*, **704**: 461-469 (1982))。及びRijken, D. C. 等, *J. Biol. Chem.*, **257**: 2920-2925 (1982))。このようにプラスミン・ゲルも高濃度で存在する(Wiman, B. 等, *Nature*, **272**: 549-550 (1978))。冠動脈血栓に、静脈内投与されたt-PAが結合すると血栓の部位でプラスミンが有効に製造され、そこで最高に働く。

【0023】現在、t-PAは最初にボーラスの形態で投与され、その後一定の注力を受ける。3時間の標準の治療の間に投与される酵素の合計量は一般に約50-100mgである。2つの理由でこのような大量を必要とすることが明白である。第1に、肝細胞による循環からの急速なt-PAのクリアランスの効果を補うため(Krause, J., *Fibrinolysis*, **2**: 133-142 (1988))、及び第2に、血漿及び血小板中に存在する比較的高濃度のセリン・プロテアーゼ

インヒビターの影響を克服するため (Carrell, R. W. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁403-420 (1986))。

【0024】t-PAの主な生理学的阻害剤はセリピン、PAI-1、約50kdの糖タンパク質である (Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986); Ginsterg, D. 等, J. Clin. Invest., 78:1673-1680 (1986); 及びCarrell, R. W. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁403-420 (1986))。PAI-1は心筋梗塞から生き残った人からの血漿のフィブリン溶解現象の能力が減少している原因とされてきた (Hamsten, A. 等, New Eng. J. Med., 313:1557-1563 (1985))。さらにPAI-1は急性期反応性タンパク質であり、心筋梗塞に伴いその量が増加することにより、治療のためのt-PAの注入後に血漿中に残った実質的量のt-PAのフィブリン溶解現象活性を減衰させる (Lucore, C. L. 等, Circ., 77:660-669 (1988))。PAI-1とt-PAの結合の2次速度定数は非常に高い (Hekman, C. 等, Arch. Biochem. Biophys., 262:199-210 (1988))。人の血漿によるt-PAの最初の“急速相 (fast phase)”阻害を説明している (Colucci, M. 等, J. Lab. Clin. Med., 108:53-59 (1986))。従ってインヒビタにおけるPAI-1によるt-PAの急速な中和は、急性心筋梗塞の治療をした10%から35%の患者が冒される合併症である。血栓溶解治療後の冠動脈ステントに寄生しうる (Chesbro, J. H. 等, Circ., 76:142-154 (1987))。

【0025】C1エステラーゼ・インヒビター、及びアルファ-2-アンチplasminなどの他のセリピンとt-PAの結合定数はPAI-1の場合より低次数である (Ranby, M. 等, Throm. Res., 27:175-183 (1982); 及びHekman, C. 等, Arch. Biochem. Biophys., 262:199-210 (1988))。それにもかかわらずこれらのセリピンは注入されたt-PAと結合し、t-PAの有利な薬理学的性質を減衰させることができる。

【0026】t-PA及びPAI-1の他に多くのセリピン・プロテアーゼ・セリピンの対が医学的に非常に重要である。例えばu-PAはt-PAと同様に心筋梗塞の治療に有用であり、t-PAと同様のセリピン・プロテア

ーゼ・インヒビターによる阻害を受ける。

【0027】傷における血餅形成の促進に局所的に使用されるセリピン・プロテアーゼであるトロンビンはプロ凝固剤である。それと同起源のセリピンである、アンチトロンビン-111は、トロンピン・及びVIIa, Xa, XIa及びXIIaを含む血液凝固カスケードに関与する多くのセリピン・プロテアーゼを特異的に阻害する凝固防止剤である (Heimbürger, N. 等, 於: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 出版Fritz, H. 等, Walter de Gruyter, New York, 頁1-22 (1971); Kuraeni, K. 等, Biochem., 15:373-377 (1976); Kirach, K. 等, Biochem., 16:5831-5839 (1977); 及びOsterud, B. 等, Semin. Thromb. Haemost., 35:295-305 (1976))。アンチトロンビン-111は播種性血管内血液凝固の治療に使用されてきた。トロンピンによりプロテインCを活性化すると、活性化プロテインCが凝固因子Va及びVIIIaを不活性化し、それ自身はそれと同起源のセリピン、プロテインC・インヒビターにより阻害されるので血液凝固過程の自己制限が起こる。

【0028】子宮収縮を起こす、血管の浸透性を増す、及び血液凝固の内部経路を起こす機能を持つカリキレインは、比較的重要なセリピンのひとつである。アルファ-1-アンチトリプシンにより阻害を受ける。

【0029】アルファ-1-アンチトリプシンはトリプシンと同様に白血球エラスターゼ、及びカプシンにも阻害する (Heimbürger, N. 等, 於: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 出版Fritz, H. 等, Walter de Gruyter, New York, 頁1-47 (1971); Janoff, A., Am. Rev. Resp. Dis., 105:121-127 (1972); 及びOhlsson, K. 等, Eur. J. Biochem., 36:473-481 (1973))。アルファ-1-アンチトリプシンの遺伝子欠失は直接気腫に関連し (Carrell, R. W. 等, Trends

【0030】Biochem. Sci., 10:20-24 (1985))。従ってアルファ-1-アンチトリプシン置換が気腫の治療に使用されてきた (Marx, J. L., Science, 243:315-316 (1989))。

【0031】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的

は、キモトリプシン、スーパーファミリーの野生型セリン・プロテアーゼ、特に野生型P1Aをタンパク質工学により改良し、必ずしも他の有利な薬理学的性質を変えることなくその酵素有効性を増し、及び、又は必要な変異量を変えることである。

【0032】本発明のもうひとつの目的は、キモトリプシン・スーパーファミリーの改良セリン・プロテアーゼをコードする遺伝子を提供することである。

【0033】本発明のさらに別の目的は、特にセルビリンファミリーの野生型セリン・プロテアーゼ・インヒビター、特に野生型P1A-1を変え、それらの阻害有効性を増し、及び、又はその投薬必要量を変え、本発明の変異セリン・プロテアーゼを阻害することができるようにすることである。

【0034】本発明のさらに別の目的は、改良セリン・プロテアーゼ・インヒビターをコードする遺伝子を提供することである。

【0035】本発明のこれらの、及び他の目的は、同起発の阻害剤による阻害に対して抵抗性であるキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・変異株、及びそれをコードする遺伝子にならびにセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害するセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子により満たされ、これは下文に示す本発明の詳細な説明により明らかとなるであろう。

【0036】

【課題を解決するための手段】上記で議論した通り、本発明の上記の目的は、それらと同起発の阻害剤による阻害にたいして抵抗性を持つキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ変異株、及びそれをコードする遺伝子を用いたひとつの具体化により達成することができた。

【0037】本発明のもうひとつの具体化において、本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害するセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子により上記の目的を達成した。

【0038】さらに別の具体化において、本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株はキモトリプシン・スーパーファミリーの野生型セリン・プロテアーゼをも阻害する。

【0039】エントロプターゼ（このセリン・プロテアーゼ・サブファミリーのメンバーはすべて相同タンパク質であり、共通の使用機構を有するので、本発明において使用するキモトリプシン・スーパーファミリーの特定のセリン・プロテアーゼはここで重要ではない。そのようなキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼの特別な例には上記で述べたセリン・プロテアーゼ、すなわちP1A、トリプシン、トリプ、

リノールプロテアーゼ、キモトリプシン、パラカニン、エラスターゼ、u-PA、フィリピン、活性型ブレイキン、C1エステラーゼ、カニゲン、G、チラーゼ、及びカリキレイン、トリプシン、及び因子X11a、IXa、Xa、XIa、ならびにX11aを含む血液凝固カスケードのプロテアーゼが含まれる。本発明において使用した好ましいキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼはP1Aである。

【0040】キモトリプシン・スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害にたいして抵抗性を示す特定のセリン・プロテアーゼ・インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなインヒビターの例にはBPT1ファミリー、Kazal1ファミリー、SSIファミリー、セルビリンファミリー、表豆トリプシンインヒビター（Kunitz）ファミリー、ザンテドインヒビターファミリー、及びサーマリン・スーパーファミリーのメンバーが含まれる。

【0041】キモトリプシン・スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す特定のBPT1インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなBPT1インヒビターの例にはBPT1-1、バビ毒インヒビター、インスターアルファインヒビター、及びA4アミロイド前駆体A4695が含まれる。

【0042】キモトリプシン・スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す特定のKazal1インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなKazal1インヒビターの例にはすい臓分泌インヒビター、オボムコイド、及び精漿アクロシン・インヒビターが含まれる。

【0043】キモトリプシン・スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す特定のセルビリン・インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなセルビリン・インヒビターの例にはPA1-1、PA1-2、PA1-3、C1エステラーゼ・インヒビター（C1inh）、プロテインC・インヒビター（PCinh）、ヘパリン・補因子11（HC11）、アルファラーゼ・アンチプラズミン（A2AP）、アンチコレステロール（AT11）、アルファ1-アンチトリプシン（A1AT）、プロテアーゼ・ネクシン（Nex-1）、コントラプシン（Contrps）、成長ホルモン調節タンパク質（GHRP）、及びアルファ1-アンチキモトリプシン（ACHym）が含まれる。キモトリプシン・ファミリーのセリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す好ましいセルビリンはPA1-1である。

【0044】本発明のキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害することができる変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターをそれらの誘導すること

ができる特定のセリン・プロテアーゼ・インヒビターは、本発明において重要ではない。そのようなセリン・プロテアーゼ・インヒビターの例にはBPTI, Kazal, SSI, Kunitz, パテト・インヒビター、スーパーファミリー・インヒビター、及びセリン・プロテアーゼのメンバーが含まれ、PAI-1, PAI-2, PAI-3, C1エステラーゼ・インヒビター、プロテアーゼ・インヒビター、ペプチン・補因子-11, アミノカーボキシアチブラクミン, アンチトリプシン, III, アルファ α -1-アンチトリプシン, プロテアーゼ・インヒビター-I, コレステラチン, 成長ホルモン・調節タンパク質、及びアルファ α -1-アンチトリプシンなどのセリン・ファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビターが好ましい。キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害する好ましい変異カルピンはPAI-1である。

【0045】すべての周知のセリン・プロテアーゼ・インヒビターはその活性中心ループにおいて構造的に相同であり、それらと同源のセリン・プロテアーゼと類似の相互作用を行う(Read, R. J. 等, 於 Proteinase Inhibitors, 出版: Barret, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁301-336 (1986))。セリン・プロテアーゼ、及びセリン・プロテアーゼ・インヒビター間の構造における応答はこれまでに研究されたことのない複合体のモデルの構築に利用することができる。

【0046】 t -PA、及び他のセリン・プロテアーゼの触媒ドメインの間の構造的相同性が高いので(Blundell, T. 等, Nature, 326, 347-352 (1987))、本発明においてトリプシン、及びBPTI間の複合体の周知の構造(Huber, R. 等, J. Mol. Biol., 89, 73-101 (1974)) ; 及びBode, W. 等, 於 Proteolysis and Physiological Regulation, Academic Press, New York, 頁43-76 (1976))、従ってPAI-1のE₃₅₀は t -PAのR₃₀₄とイオン対を形成すると思われる。

【0047】アミノ酸残基₂₁₄SWGSG₂₁₇の周辺の領域はキモトリプシン・スーパーファミリーのすべてのメンバーの間に高度に保持されている。反対にアミノ酸残基₄₁NSGYHF₄₁の周囲の領域は比較的变化に易く、インヒビターと相互作用をける表面の部分形成する。図1に示される通りこの領域の t -PAのアミノ酸配列は多くの大きな点でトリプシンのアミノ酸配列と異なる。第1にトリプシンのTyr (Y₃₉) 残基が t -PAにおいてはArg (R₃₀₄) で置換されている。 t -PA及びPAI-1の間の相互作用がトリプシン及びBPTIの間の相互作用を模倣しているという仮定に基づきモデルは t -PAのR₃₀₄がPAI-1のGlu (E₃₅₀) 残基と塩橋を形成することを示唆する。このPAI-1のGlu残基の位置は、トリプシンのY₃₉とアソシエーデル・ローレンス結合を形成するBPTIのI₁₉に対応する(下表VII) (Huber, R. 等, J. Mol. Biol., 89, 73-101 (1974)) ; 及びBode, W. 等, 於 Proteolysis and Physiological Regulation, Academic Press, New York, 頁43-76 (1976))、従ってPAI-1のE₃₅₀は t -PAのR₃₀₄とイオン対を形成すると思われる。

【0048】

表VII

	P1	P4'
	12	24
BPTI	GPCKATIIIRYFYN	
	343	355
PAI-1	VSARMAFEEIIMD	
	557	569
PLG	CPGRVVGGCVAMP	

第2に t -PAは、 t -PA (R₃₀₄) 及びPAI-1 (E₃₅₀) の間の接点と思われる位置に隣接して位置する十分な7個のアミノ酸(₃₀₂KHRRSPG₃₀₂, 図1を参照)を有する。これらの7個のアミノ酸中の4個は正に帯電しており、PAI-1 (₃₅₀EEIIMD₃₅₃) の相補的領域と思われる領域は3個の負に帯電した残基を含む。本発明においては、これらの領域間の静電的相互作用が t -PA及びPAI-1の間の複合体の形成、及び安定化に重要な役割を果たし得ると思われる。

た。逆に t -PAがその基質である。同領域に負に帯電した残基を持たないプラスミノーゲン(PLG)と相互作用を行う場合はこのような相互作用が起こり得ない(上記表VIIを参照)。

【0049】図1に示すようなキモトリプシン・スーパーファミリーの種々のセリン・プロテアーゼの配列の比較は、キモトリプシン・スーパーファミリーの種々のセリン・プロテアーゼの1種類又はそれ以上の変異を設計してそれらと同源の野生型阻害剤による阻害に対して抵

抗性とするための指針として使用することができる。t-PAと同様に図1に示すキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼは、重要な結合残基（トリプシンのY₃₃₃）及び結合残基に隣接して位置する種々の大きさの挿入残基を含む点でトリプシンと異なる。従って変異の候補の例には以下が含まれる：

(i) 他のセリン・プロテアーゼにおいてトリプシンのTyr (Y₃₃₃) (EPTIのIle (I₃₃))と結合し、従って2個のタンパク質間の相互作用において重要な役割を果たす残基の位置に対応する位置を占めるアミノ酸残基。例えばブラキミンにおいて、Met (M) 残基はトリプシンのY₃₃₃に対応する位置を占める。このMet残基を電荷、又は大きさなどの性質の異なる他のアミノ酸（例えばGlu (E)）に変異させると、ブラキミンのアナフィラキシンによる不活性化に対する感受性がなくなるか、又は減少することが期待されるが、使用する特定の置換アミノ酸は本発明において重要でない。同様にトロンボリンのGln (Q) 残基（トリプシンのY₃₃₃に対応する位置を占める）を電荷、又は大きさなどの性質が異なる別のアミノ酸（例えばAsp (D)）に変異させると、トロンボリンのアナフィラキシンによる不活性化に対する感受性がなくなるか、又は減少することが期待されるが、使用する特定の置換アミノ酸は本発明において重要でない。及び

(ii) トリプシンには存在せず、分子の表面の小さい挿入として活性部位の近2に位置するキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼの残基（図1を参照）。例えばブラキミンは結合残基に隣接してt-PAの₂₉₆KHRRSPG₃₀₂により占められている位置に対応する位置に、2個のアミノ酸（RF）の挿入

を含む。これらの2個のアミノ酸のどちらか、又は両方の欠失、又は置換、あるいは少量の別のアミノ酸の挿入による変異により、必ずしもセリン・プロテアーゼの触媒部位に影響することなく阻害剤との相互作用を失わせる、又は減少させることが期待される。もうひとつの例として、u-PAは結合残基に隣接してt-PAの₂₉₆KHRRSPG₃₀₂により占められている位置に対応する位置に6個のアミノ酸（RHRGGS）の挿入を含む。これらの6個の残基の変異、又は欠失は変異t-PA（De1₂₉₆₋₃₀₂）の場合に観察される相互作用と類似の方法によるセリン・プロテアーゼ・インヒビターとの相互作用が減少する、又はなくなることを期待される。

【0050】同様に、セリン・プロテアーゼ・インヒビターの活性中心内の領域は非常に変化し易く、セリン・プロテアーゼと相互作用を行う表面の部分を作成する。図2〜3に示すようなセルピレン・ファミリーの種々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターの配列の比較は種々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにおいて、特にセリン・プロテアーゼ・インヒビターのセルピレン・ファミリーのメンバーに、本発明のキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを有効に阻害することができるような1種類かそれ以上の変異を起こす設計の指針として利用することができる。PAI-1と同様に図2〜3に示した他のセルピレン・ファミリーのメンバーは、重要な結合アミノ酸残基（PAI-1のE₃₅₀）における配列が異なり、結合残基に隣接した位置に種々の大きさの挿入を含む（下表VII Iを参照）。

【0051】

表VII I

セルピレン	3 4 4 P1-P1'	3 5 8
a PAI-1	SA-FMAPEE-----IIMDRPF	
r PAT-1	SA-FMAPTE-----MVLDRSF	
b PAI-2	TG-ETGHGG----PQFVADHFP	
a A1AT	IP-MSIPPE-----VKFNKPF	
b A1AT	IP-MSIPPE-----VKFNKPF	
m A1AT	VP-YSMPPPI-----LRFDHFP	
r GHRP	L--KSLPQTI--PLLNFNKPF	
b AClym	TL-LSALVETRTI-VRFNRPF	
m Cntrps	GIEKAILPA-----VHFNRPF	
b ATIII	AG-RSLNPN--RVTFKANRPF	
h HCII	MP-ISTQVR-----FTVDRPF	
h A2AP	S--RMSLQSR-----FSVNRPF	
h Cjnh	AA-FTLLV-----FEVQQPF	
b PCrh	TF-RSARLN--SQRLVFNRPF	
r Nex-1	A--ESSPPW-----FIVDRPF	

(h=ヒト；r=ラット；b=ヒビ；およびm=マウス)

従って変異の候補の例には以下が含まれる：

(i) 他のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにおいて

て、PAI-1のGlu (E₃₅₀) とt-PAのArg (R₃₀₄) と結合して、従って2つのタンパク質の相互作用において重要な役割を果たす残基の位置に対応する位置 (P4') を占めるアミノ酸残基。本発明においては、t-PAにおけるR₃₀₄→E変異の構築によりこゝわれた静電的相互作用を復活させるためにPAI-1 (E₃₅₀) のGlu残基をArg (R) に変異させた。このセルシンにおける特異的な変異は、セリン・プロテアーゼに導入され野生型セルシンによる阻害に対する抵抗性を付与した変異と相補的であるように構築された。セルシンにおけるこの相補的E₃₅₀→R変異はセルシンには本発明のキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害する能力を与えるために特別に選んだ。しかし使用した特定の置換アミノ酸は本発明に対して重要ではない。例えばトリプシンのY₃₈₂に対応するアラミンのMet (M) 残基 (C158) を電荷又は大きさなどの性質の異なる別のアミノ酸 (上記の例のようにGlu (E)) に変え、変異アラミンが野生型アルファ₁-アンチトラスミンによる阻害に対する感受性の減弱を付した場合、アルファ₁-アンチトラスミンのP4' Ser (S) 残基を、アラミンに対して代わったGlu残基と相互作用のできる他のアミノ酸 (例えばArg (R)) に変異させると、変異アルファ₁-アンチトラスミンによる不活性化に対する変異アラミンの感受性が復活することが期待される。同様にトロンシンの変異に関する上記の例のようにトロンシンのGln (Q) 残基A₁₁₁ (11) に変えた場合、アンチトロンシン-111のP6' Arg (R) 残基をGlu (E) に変異させると変異アンチトロンシン-111による阻害に対する野生型インヒビター抵抗性トロンシンの感受性が復活することが期待される。

(c) 同種のセリン・プロテアーゼとの相互作用表面を形成する、種々のスーパーファミリーセリン・プロテアーゼ・インヒビターの他のメカニズムの活性中心内の余分な残基。セリン・プロテアーゼ・インヒビターのセルシンファミリーに関してこれらの残基を上記の表V111に示す。

例えばアルファ₁-アンチトラスミンは活性中心のPAI-1の₃₄₅APPE11MD₃₅₅に対応する位置に配列SLSSFSVNを含む。これらの8個のアミノ酸のいずれかの置換により、又は少量の別のアミノ酸の挿入により変異を起こすと、これら置換又は挿入が電荷、大きさ、あるいは疎水性などの性質において、セリン・プロテアーゼに導入されて最初に野生型セルシンに対する抵抗性を付与したアミノ酸残基と相補的であればセリン・プロテアーゼとの相互作用を復活することが期待される。

【0052】本発明の変異セリン・プロテアーゼ、及び変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、例えばオ

リゴヌクレオチド・媒介突然変異誘発などの周知の方法により製造することからできる (Zoller, M. 等, JNA, 3:479-488 (1984); Kunkel, T. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:488-492 (1985); 及びKunkel, T. 等, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1987))。しかしセリン・プロテアーゼ、又はセリン・プロテアーゼ・インヒビターに変異を起こす正確な方法は本発明にとって重要ではない。

【0053】本発明の変異セリン・プロテアーゼは、Lottenberg, R. 等, Meth. Enzymol., 80:341-361 (1981) に記載の方法などの周知のアッセイを用いて所望の性質、すなわちセリン・プロテアーゼ活性、及び同起源の阻害剤による阻害に対する抵抗性を持つセリン・プロテアーゼに関してスクリーニングを行うことができる。

【0054】本発明の変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、Lottenberg, R. 等, Meth. Enzymol., 80:341-361 (1981), Holmes, W. E. 等, Biochem., 26:5133-5140 (1987), 及びHeckman, C. M. 等, Arch. Biochem. Biophys., 262:199-210 (1988) に記載の方法などの周知のアッセイを用いて所望の性質、すなわち本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼに対するセリン・プロテアーゼ・インヒビター活性を有するセリン・プロテアーゼ・インヒビターに関してスクリーニングを行うことができる。

【0055】本文に記載する研究は、セリン・プロテアーゼを突然変異誘発により修正し、キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ、及びそれと同起源の阻害剤の間で相互作用を減少させる、又はなくすることが可能であることを初めて示すものである。これにより変異セリン・プロテアーゼは同起源の阻害剤の存在下で野生型の酵素より酵素活性が多く残り、残留活性の量はそれと同起源の阻害剤との相互作用が阻害される程度に依存している。そのような変異セリン・プロテアーゼの救済は多種類の臨床的、及び商業的用途において有益であると思われる。例えば活性化プロテインCの変異型は、血液の凝固を阻害するのが有利である場合有用であると思われ、本文の実施例1に記載のt-PAの変異型が、フィブリン溶解現象を延長する必要がある場合に血栓性の異常のある患者の循環におけるt-PAの有効寿命を延ばすのに有用であると思われるのとちょうど同じである。

【0056】本文に記載した研究は又、セリン・プロテ

アーゼ、インヒビターを突然変異誘発により修正し、セリン、プロテアーゼ、インヒビターの構造を適切に変化させることにより、キモトリプシ、スーパーファミリ-のセリン、プロテアーゼ、インヒビター抵抗性変異セリン、プロテアーゼ、及びそれと同起源のセリン、プロテアーゼ、インヒビター間の相互作用を機能的に復活させることが可能であることを初めて示すものである。これにより同起源の野生型セリン、プロテアーゼ、インヒビターが存在する場合より急速に変異セリン、プロテアーゼを不活性化することができ、阻害の速度は変異セリン、プロテアーゼとの相互作用が復活した程度に依存する。このような変異セリン、プロテアーゼ、インヒビターの投与は、多種の臨床的及び産業的用途においてセリン、プロテアーゼ、インヒビター抵抗性セリン、プロテアーゼの活性を制限するのに有益であると思われる。例えばプロテインC、インヒビターの変異型は、活性化プロテインCの変異型が存在して血液の凝固を促進するのが有利であるような場合に有用であると思われる。同様にPAI-1の変異型は、侵入的な方法が必要な場合に、血栓性異常の治療をした患者の循環においてセリン、プロテアーゼ、インヒビター抵抗性t-PA、例えばt-PA (R₃₀₄→E)の有効寿命を短縮するのに有用であると思われる。従ってこのような変異セリン、プロテアーゼ、インヒビターはセリン、プロテアーゼ、インヒビター抵抗性セリン、プロテアーゼの解毒薬として使用することができる。

【0057】臨床的用途において投与すべき本発明の変異セリン、プロテアーゼの量、使用する特定の変異セリン、プロテアーゼ、所望するセリン、プロテアーゼの治療効果、及び性別、年齢、体重、ならびにプロテアーゼを投与する患者の生理学的条件などの因子に依存するであろう。変異セリン、プロテアーゼの使用量は日常の実験により決定することができる。臨床的用途において投与すべき本発明の変異セリン、プロテアーゼ、インヒビターの量は使用する特定の変異セリン、プロテアーゼ、インヒビター、所望するセリン、プロテアーゼ、インヒビターの治療効果、及び性別、年齢、体重、ならびにセリン、プロテアーゼ、インヒビターを投与する患者の生理学的条件などの因子に依存するであろう。変異セリン、プロテアーゼ、インヒビターの使用量は日常の実験により決定することができる。

【0058】本発明の変異t-PAは適したインビトロ、及びインビボ、モデルにおける試験、ならびに臨床試験により決定した通りに投与しなければならない。必要な投与量は野生型t-PAの場合の必要量の10-1

000分の1となるであろうと思われる。

【0059】本発明の変異PAI-1も適したインビトロ、及びインビボ、モデルにおける試験、ならびに臨床試験により決定した通りに投与しなければならない。必要な投与量は変異t-PAの場合に必要な量と大体同じであろうと思われる。

【0060】本発明の変異セリン、プロテアーゼは文献により周知のいずれの製薬上許容できるキャリアー、又は希釈液、例えば生理食塩溶液と共にでも投与することができる (Lucore, C. L. 等, *Circ.*, **77**: 660-669 (1988), 及びChesbro, J. H. 等, *Circ.*, **76**: 142-154 (1987))。

【0061】本発明の変異セリン、プロテアーゼの特定の投与形態はその特定の用途に依存する。そのような投与形態の例には、静脈内又は腹腔内注射、冠動脈内注入、局所的適用、及びエーロゾル吸入が含まれる。

【0062】本発明の変異セリン、プロテアーゼ、インヒビターの特定の投与形態はその特定の用途に依存する。そのような投与形態の例には、静脈内又は腹腔内注射、冠動脈内注入、局所的適用、及びエーロゾル吸入が含まれる。

【0063】以下の実施例は説明のみを目的としており、本発明の範囲をどのようにも制限するものではない。

【0064】

【実施例】実施例1

t-PA変異株

本実施例に記載する方法はセリン、プロテアーゼとしてt-PAを使用し、同起源のセリン、プロテアーゼ、インヒビターとしてPAI-1を使用する場合を対象とするが、上記のようなキモトリプシ、スーパーファミリ-の他のセリンプロテアーゼ、及び上記のようなそれと同起源の阻害剤も本発明の精神と範囲から逸脱することなく本文に記載の方法により容易に使用することができる。

【0065】A. 突然変異誘発のためのt-PA部位の選択

t-PAの残基Arg₃₀₄及び¹²⁹⁶KHRKSPG₃₀₂がPAI-1と相互作用をするという仮定を試験するため、オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発を用いて下表IXに示すt-PAの3種類の変異型を製造した。

【0066】

表IX

野生型t-PA	FAKHRRSPGERFLC
t-PA (Arg ₃₀₄ →S)	FAKHRRSPGESFLC

t-PA (Arg₃₀₄→E)
t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)

変異t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)は上記で議論したトリプシンには存在しない7個のアミノ酸挿入を含み、同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1と相互作用する部分のt-PA配列を完全に除去して構築した。変異株t-PA (R₃₀₄→S)及びt-PA (R₃₀₄→E)はArg₃₀₄がそれぞれSer及びGluに置換されており、正に帯電したArg残基を選択的に変え、それと同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1との相互作用を除去するように選んだ。R₃₀₄に対して、電荷対相互作用の欠落のため同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビターに対する感受性の減じたt-PAを与える種々の他の置換を行うことができる。例えばループ中の正に帯電した残基(残基296-302)を負に帯電した、又は中性のアミノ酸に変える変異は、t-PA及びPAI-1の間の相互作用を妨げる、減少させる、又は不安定化すると予測される。P₃₀₂をGly (G)以外の他のアミノ酸で置換することにより類似の結果を得ることができる。さらに残基304と305の間、又は残基296と305の間どこかに、PAI-1の残基と全く相互作用しない約1-6個のアミノ酸の系列を挿入するように挿入変異を行うことができる。異なる置換、及び、又は置換、挿入及び欠失の組み合わせは、t-PAとPAI-1の相互作用に異なる程度で影響し、それによって特定の用途、又は臨床的条件に適する性質を持った種々のt-PAを製造することができるであろう。

【0067】B. t-PAのオリゴヌクレオチド-媒介突然変異誘発

t-PAのオリゴヌクレオチド-媒介突然変異誘発は基本的にZoller, M. 等, DNA, **3**: 479-488 (1984)の記載に従い、Kunkel, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 488-492 (1985); 及びKunkel, T. 等, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1987)による修正により行った。

【0068】第1に、ヒトのt-PA全長をコードするcDNAをクローニングした複製を含むプラスミドpSVT7 (R17)にt-PAを、Sambrook, J. 等, Mol. Biol. Med., **3**: 459-481 (1986)に従って挿入した。pSVT7 (R17)にt-PAはpSVT7の誘導体であるBird, P. M. 等, J. Cell Biol., **105**: 2905-2914 (1987) (図4を参照)。

【0069】pSVT7はpKC3から構築した。pKC3は、Ava I部位からEcoRI部位までのpBR

FAKRRSPGEEFLC
FA. ERFLC

322-誘導配列(これは複製の源、及びβ-ラクタマーゼ遺伝子を含む)がpUC-8 (Messing, J., Meth. Enzymol., **101**: 20-78 (1983))の配列に置換されているpko (Van Doren, K. 等, J. Virol., **50**: 606-614 (1984))の誘導体である。さらに独特のHind III部位にポリリンカーが挿入されており、SV40オリジン上のPvu II部位上流がCla I部位に変換されている。ベクターpSVT7はバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ特異性プロモーターを含む20個の塩基対フラグメント (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)をpKC3の独特のStu I部位に挿入することによって得た。このStu I部位はSV40の初期領域から誘導した配列内のSV40配列のヌクレオチド5190の位置、初期転写の開始点から下流約30塩基対にある (Goose, J. 等, DNA Tumors Viruses, Cold Spring Harbor Press, 頁813 (1981))。

【0070】その後EcoRI-DNAポリメラーゼのクレゾールフラグメントを用いて、ぼんた3'-末端を高たすことにより甲一のEcoRI部位をpSVT7から除去した。得られた発現ベクターをpSVT7 (R17)と称する (図4を参照)。

【0071】次に野生型t-PAをコードするcDNAをプラスミドpL611から切り出し (Sambrook, J. 等, Mol. Biol. Med., **3**: 459-481 (1986); Genetics Institute, Boston, MAから提供)、pSVT7 (R17)に挿入した。pL611はt-PAのAUG開始コドンからすく上流にNco I及びBamHIの切断部位を導入する合成オリゴヌクレオチドを含む。t-PA cDNAの3'非翻訳配列内のTGA終結コードの下流約280塩基対の位置にBam I部位がある。プラスミドpL611から切り出したt-PA cDNAの約1965塩基対Nco I-Bam IフラグメントにXba Iリンカーを加えた。このNco I-Bam Iフラグメントは完全なt-PAタンパク質をコードする配列を含むが、(1) t-PA mRNAの3'非翻訳領域、及び(2) t-PA mRNAの5'非翻訳領域全体、すなわちSal I部位及びATG開始コードの間の配列に対応する配列が欠けている (Pennica, D. 等, Nature, **301**: 214-221 (1983))。各末端にXba I部位を持つt-PA cDNAのフラグメント (Sambrook, J. 等, Mol. Biol. Med., **3**: 459-481 (1986))をpSVT7にt-PAの製造に使用した (図4を参照)。得られたプラスミドからXba Iを

用いた消化。0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動による精製により約1970塩基対DNAフラグメントを切り出し、 λ -t-PAのN-末端をコードする配列がバクテリオファージT7及びSV40初期プロモーターのすぐ下流におかれるようにしてプラスミドpSVT7 (RI7) のXbaI部位に挿入した。得られたプラスミドをpSVT7 (RI7)- λ -t-PAと称した (図4を参照)。

【0072】その後pSVT7 (RI7)- λ -t-PAをEcoRIを用いて完全に消化した。 λ -t-PAの472塩基対フラグメント (アミノ酸206-364を含む領域をコードする871bp) (842-1314) を1.2% (w/v) アガロースゲル電気泳動により精製した。このフラグメントを、前記EcoRIで消化した腸菌からバクテリオファージ脱オクザリル化したバクテリオファージM13mp18 (Yanish-Perron, C. 等, Gene 33:103-119 (1985)) の複製型DNAと連結した (図4を参照)。

【0073】他に特定しない場合は本文に記載するこれらの、及び他の標準的組み替えDNA法は (i) Maniatis, T. 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1

版, Cold Spring Harbor (1982), 及び (ii) Meth. Enzymol., 152巻, 出版Berger, S. 等, Academic Press, New York (1987) に記載の要領で行った。

【0074】連結DNAをE. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) にトランスフェクションした。組み替えバクテリオファージにより形成された白いプラークを採取し、適切な472塩基対EcoRIフラグメントの存在を制限マッピング、サザンハイブリッド形成、及びDNA配列決定により確認した。

【0075】Kunkel, T. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492 (1985); 及びKunkel, T., Meth. Enzymol., 154:367-382 (1987) の記載に従い、5'-ホスホリル化合成突然変異誘発プライマーを用いて472塩基対EcoRIフラグメントにおける変異を導入した。 λ -t-PA変異株の構築に使用した3種類の突然変異誘発プライマーの配列は以下である。

t-PA (R ₃₀₄ -S)	5' GCCCGGAGAGTCTCTGTGC 3'
t-PA (R ₃₀₄ -E)	5' GCCCGGAGAGTCTCTGTGC 3'
t-PA (Del ₂₉₆₋₃₀₂)	5' GCCATCTTTGCCGAGCGGTCTCTG 3'

上記原案はdut⁻, ung⁻であるE. coliの株、すなわち株CJ236において製造したDNA鋳型を使用する (Kunkel, T. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492 (1985), 及びKunkel, T., Meth. Enzymol., 154:367-382 (1987))。DNA鋳型はチミンの位置に1塩のウラシル残基を含む。

【0076】突然変異誘発プライマーをインビトロで伸ばした後、部分的な塩環状DNAをdut⁻, ung⁻であるE. coliの株、すなわちTG-1にトランスフェクトした (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984))。鋳型らせん中のウラシル残基を酵素ウラシル-N-グリコシラーゼ的作用によりインビボで除去した。これにより鋳型らせんに致死損害が加えられ、変異株を迅速に、及び有効に回収することができ。

【0077】特に、ウラシル含有鋳型DNAを上記した5'-ホスホリル化突然変異誘発プライマーにアニール

した。プライマーの伸長はE. coli DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントを用いて15℃にて12-16時間行った。新規に合成したらせんをバクテリオファージT4 DNAリガーゼを用いて突然変異誘発プライマーの5'末端に連結し、不正確な持つ環を形成した。得られたDNAを用いてE. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) のトランスフェクションを行い、多くのプラークから一重鎖DNAを製造した。これらのDNAの配列を完全に決定した。その後立証された変異株の複製型2重鎖DNAを、EcoRIによる消化、及び1.2% (w/v) アガロースゲルによる電気泳動により分離した。下記に詳細に記載する通り、変異を含むこれらのフラグメントを使用して問題の λ -t-PA変異株をコードする λ -t-PA-DNAのクローニングを構築した。

【0078】C. 変異株 λ -t-PAのための発現ベクターの構築

プラスミドpSVT7 (RI7)- λ -t-PAにおける λ -t-PAの変異株は以下のようにして構築した: λ -t-PA

cDNAの中心472塩基対EcoRIフラグメントをEcoRIによる消化、及び1.2% (w/v) のアガロースゲルによる電気泳動によりpSVT7 (RI7) / λ t-PAから除去した。その後残ったプラスミドDNAの直線状フラグメントをオリゴヌクレオチド-媒体-突然変異誘発によって作った472塩基対フラグメントのハイブリッドに連結した(図4を参照)。導かれたプラスミドはpSVT7 (RI7) / λ t-PA (R₃₀₄-S)、pSVT7 (RI7) / λ t-PA (R₃₀₄-E)、及びpSVT7 (RI7) / λ t-PA (Del₂₉₆₋₃₀₂)と称した。

【0079】E. coli株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, 出版: Oxford, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁109-155 (1985))を上記の変異株プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpSVT7 (RI7) / λ t-PA (R₃₀₄-S)、[DH-1] ; pSVT7 (RI7) / λ t-PA (R₃₀₄-E)、[DH-1] ; 及びpSVT7 (RI7) / λ t-PA (Del₂₉₆₋₃₀₂) [DH-1]と称した。正しいフラグメントの存在は選した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成により確認し、フラグメントの配向は適した突然変異誘発オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた制限マッピング、及びDNA配列決定により確認した。

【0080】pSVT7 (RI7) / λ t-PA (R₃₀₄-S) [DH-1]、pSVT7 (RI7) / λ t-PA (R₃₀₄-E) [DH-1]、及びpSVT7 (RI7) / λ t-PA (Del₂₉₆₋₃₀₂) [DH-1]はAmerican Type Culture CollectionにそれぞれATCC番号67894、67896及び67895として供託した。

【0081】D. COS細胞のトランスフェクションに100mmの皿当たり約10⁶個のCOS細胞 (G. Lutzman, Y. 等, Cell, 23:175-182 (1981))をアルウリシス法により精製した。1.0 μ gの適したプラスミドDNAを用いてトランスフェクトした (Maniatis, T. 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1版, Cold Spring Harbor (1982))。特に、吸引により培地をCOS細胞から除去し、単層を10mMのHEPES (pH7.15) (Sigma Chemical Co.)を含む5.0mlのダルベッコの培地 (GIBCO, Inc.)で1回洗浄した。洗浄液を除去した後、300 μ g/mlのDEAE-デキストラン (Pharmacia, Inc.)を含む1.5mlの洗浄液中の単層にプラスミドDNAを加えた。その後単層を0.0%のCO₂を含む濡潤大気中、37℃にて1時間インキュベートした。この間20分毎に単層をおだやかに攪拌した。

単層をプラスミドDNAに1時間暴露した後、10mMのHEPES (pH7.15)を含むダルベッコの培地で1回洗浄し、10% (v/v)の牛胎児血清 (GIBCO, Inc.)を含む10mlのダルベッコの培地、及び100 μ Mのニコチン (Sigma Chemical Co.)を加えた。その後単層を上記に従い37℃にて4時間インキュベートし、牛胎児血清を含まず10mMのHEPES (pH7.15)を含むダルベッコの培地5.0mlで2回洗浄した。その後10% (v/v)の牛胎児血清を含む10mlのダルベッコの培地を加え、単層を上記に従い37℃にて12時間インキュベートした。そして単層を牛胎児血清を含まない同培地で5.0mlのダルベッコの培地で3回洗浄し、同培地中、37℃にてさらに30-60時間インキュベートした。DEAE-デキストランを含む溶液からプラスミドDNAを省略する以外は同様の方法で細胞をトランスフェクトし、細胞を処理した。インキュベーション期間の最後は上述の培地を細胞から集めて上記に従い分析した。

【0082】E. 困相ラジアイム/アセチルによる野生型、及び変異t-PAの定量
困相ラジアイム/アセチルは基本的にインマン、ゲルH Aに関して記載されている方法に従い (Gethin, M. J. 等, Nature, 293:620-625 (1981))、精製t-PAに対するラジアイムの抗血清1 μ g/ラジアイムを用いて行い、COS細胞中の製造された野生型、及び変異t-PAの量を定量した。この方法によって決定したt-PAの濃度は0.5-1.0 μ g/mlであった。

【0083】F. 野生型、及び変異t-PAの酵素によるアッセイ

COS細胞中に製造された野生型、及び変異t-PAの活性を決定するため、間接的色素法を行った。このアッセイにおいては、遊離のp-ニトロロアニリンが色素減法が基質、p-ニトロロアニリン (H-D-プロモイシのp-キサヒドロキシベンゾイル-p-ニトロロアニリン二酢酸塩) (American Diagnostic, Inc.)から、プラスミド-ゲル上のt-PAの作用により生成されたプラスミドの作用により放出される。遊離のp-ニトロロアニリンの放出は分光光度分析によりOD_{405nm}にて測定した。

【0084】特に、150-200 μ gの試験するべきt-PA、0.4mMのp-ニトロロアニリン、0.1 μ MのLys-β-ガラクトシダーゼ (American Diagnostic, Inc.)、及び0.5-2.5 μ g/mlの可溶性マイグリン (Des-A-マイグリン) (American Diagnostic, Inc.)を、50mMのトリス-HCl (pH7.5)、0.1M NaCl、1.0mMのEDTA及び0.01% (v/v)のジエチレングリコールを成る緩衝液に含む反応混合物を96ウェルの平底マイクロタイタ

プレート (Costar, Inc.) 中で 37°C にて、インキュベートし、2 時間の間 15 又は 30 分間隔で Bio-tek ミクロプレートリーダーを用いて OD_{405 nm} を測定した。偽-トランスフェクション細胞からの細胞液、又は適切に希釈した試料の「ブランク」を標準として分析し、得られた OD 値 (< 0.01 単位) を対応する試験値から差し引いた。各々 OD 値を 30 分と 60 分の間の光学濃度の変化として、すなわち反応の遅滞期、及び 1 本鎖 t-PA から 2 本鎖の状態への完全な変換による変化として測定した。標準的アッセイに使用する条件下で、0.1 μ M の Lys-ブラスミンノーゲン及び 2.5 μ g/ml の Des-A-フィブリノーゲン) の可溶性フィブリンは t-PA の活性を 20~40 倍賦活した。結果を図 6 に示す。

【0085】図 5 に示す通り、上記の本発明の t-PA 変異株の 3 種類全部が酵素として活性であり、その活性の特異性は野生型の活性と大きく異なるものではないことが見出された。さらに上記の本発明の t-PA 変異

酵素
野生型 t-PA
t-PA (R ₃₀₄ →S)
t-PA (R ₃₀₄ →E)
t-PA (De1 ₂₉₆₋₃₀₂)

上記の表に示す通り、異なる t-PA 変異株に関する K_m 及び K_{cat} 値は互いに類似していた。又、それらの値は Boose, J. 等, *Biochem.*, 28:635-642 (1989); 及び Hoyluer, M. 等, *J. Biol. Chem.*, 257:2912-2919 (1982) により報告されている野生型 t-PA に関する値とも類似している。

【0088】図 5 及び表 X に示されたデータは (i) t-PA のアミノ酸 296-302 の欠失、及び (ii) 304 位の Arg の Ser 又は Glu への置換が、ブラスミンノーゲンを活性化し、及び可溶性フィブリン-フィラメントにより賦活される t-PA の能力にほとんど影響しないことを示している。

【0089】アミノ酸 296-302 の欠失、及び Arg₃₀₄ の置換が t-PA と PAI-1 の相互作用に影響するかどうかを調べるために、それぞれ 250 pg (3.8 フェントモル) の野生型、及び変異株 t-PA

を 0.480 フェントモル (femtomoles) の部分的に精製した組み替え PAI-1 と共に 20 分間予備的にインキュベートした。その後上記の間接的色素法により残留酵素活性を測定した。部分的精製組み替え PAI-1 は上記の実施例 2 の記載にしたがって得た。結果を図 6 に示す。

【0090】図 6 に示す通り、3 種類の本発明の t-PA 変異株のすべてが野生型 t-PA と全く異なる挙動を示した。すなわち野生型 t-PA (■) が PAI-1 に

株は野生型 t-PA と類似の方法で Des-A-フィブリノーゲンの濃度の変化に応答することが見出された。Des-A-フィブリノーゲンによる最適刺激は 20~40 倍であった。これは Des-A-フィブリノーゲン製造を生じた野生型 t-PA についての他の観察と一致する (Karlán, B. 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 142:147-154 (1987))。それぞれの場合、Des-A-フィブリノーゲンの濃度が約 1.0 μ g/ml の場合に半最適刺激が起きた。

【0086】次に飽和濃度の Des-A-フィブリノーゲン (2.5 μ g/ml)、及び種々の濃度 (0.02~0.16 μ M) の基質、Lys-ブラスミンノーゲンの存在下における種々の形態の酵素のアッセイにより、野生型及び変異株 t-PA の K_m 及び K_{cat} 値を決定した。結果を表 X に示す。

【0087】

表 X

K _m (μ M)	K _{cat} (s ⁻¹)
0.024	0.22
0.019	0.23
0.023	0.22
0.029	0.17

より完全に阻害される条件下で (24 フェントモルの PAI-1)、変異株 t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)

(○) はその活性の約 95% を保持していた。高濃度の PAI-1 (480 フェントモルの PAI-1) が存在する場合に初めて変異株 t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)

(○) の酵素活性がかなりの減分を示した。2 種類の置換変異株、すなわち t-PA (R₃₀₄→S) (△) 及び t-PA (R₃₀₄→E) (□) も程度は異なるが PAI-1 による阻害に対して抵抗性であった。又、図 6 に示す通り、Arg の代わりに Ser 又は Glu を含む 2 種類置換変異株がその酵素活性の半最適阻害に要する PAI-1 の量は野生型 t-PA のそれぞれ 4 及び 2.5 倍であった。

【0091】上記データは、アミノ酸 296-302 及び 304 が t-PA の酵素機能に含まれておらず、同種のセリン-プロテアーゼ-インヒビター PAI-1 と酵素の相互作用に重要な役割を果たすことを示している。モデルとしてトリプシンの構造を用いて、これらのアミノ酸がセリン-プロテアーゼの活性部位の近辺、及び触媒性 3 回回転軸からある程度離れた位置にあることが予想される。したがって t-PA と PAI-1 の接触面積は t-PA とその基質であるブラスミンノーゲン相互作用より広い。

【0092】変異株 t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂) もヒトの血漿中に存在するセリン-プロテアーゼ-インヒビターの複合混合物に対して抵抗性を示すかどうかを調べる

ために、上記の原案において部分的精製組み替えPAI-1をヒトの血漿の1:100希釈液に置換した。この条件下で野生型t-PAの活性の約70%が阻害されたがt-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)の活性は影響を受けなかった。

【0093】さらに野生型t-PA及びt-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)を、希釈しないヒトの血漿と共にインキュベートし、混合物を酸性化してpH5.0とし、12,000xgで5分間遠心した。透明になった上清みを希釈し、残留t-PA活性に関して分析すると変異t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)の場合90%であり、野生型t-PAの場合20%以下であった。上記の結果は変異t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)がヒトの血漿中に存在するセリン・プロテアーゼ・インヒビターの混合混合物に対して抵抗性であることを示しており、したがって治療薬として野生型t-PAより優れているとされる。

【0094】G₅t-PA変異性

上節Fに示したデータはt-PAの残基296-302及び304が酵素、及び同起爆の阻害剤、PAI-1の相互作用に重要な役割を果たすが、基質、Lys-プラスミン・ジゲンとの相互作用には影響しないことを示す。トリプシンの周知の構造に基づいた、t-PAの触媒ドメインのモデルでは、残基296-302が酵素の活性部位の端において表面ループを形成することを予測して

t-PA (K₂₉₆->E) 5'-ATCTTTGCCGAGCAGAGGA-3'
t-PA (H₂₉₇->Y) 5'-TTTGCCAAGTACAGGAGGT-3'
t-PA (K₂₉₈->E) 5'-GCCAAGCAGCAGAGGTGCGCC-3'
t-PA (R₂₉₉->E) 5'-AAGCACAGGAGGTGCGCCG-3'
t-PA (P₃₀₁->G) 5'-AGGAGGTGCGGCGGAGAGCG-3'
t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E)
5'-GCCATCTTTGCCGAGCAGGAGGTGCGCCGAGGA-3'

変異酵素t-PA (K₂₉₆->E), t-PA (H₂₉₇->Y), t-PA (R₂₉₈->E)及びt-PA (P₃₀₁->G)を上記の要領で遷移発現ベクターpSVT7 (RI⁺)に連結した。

【0097】変異酵素t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E)及びt-PA (R₂₉₉->E)をコードするcDNAを遷移発現ベクターpSTEに連結した。pSTEはpSVT7の誘導体であり、pSTV7の350bp (ClaI-HindIIIプロモーター・オリゴン・アラグメント)をSV40-cs1085のプロモーター・オリゴン領域からの418bp (HpaI-HindIIIアラグメント)で置換することにより構築した (Dimario, D. 等, J. Mol. Biol., 140:1129-142 (1980))。

【0098】得られたプライマーをpSVT7 (RI⁺) / t-PA (K₂₉₆->E), pSVT7 (RI⁺) / t-PA (H₂₉₇->Y), pSVT7 (RI⁺) / t-PA (R₂₉₈->E), pSTE7 (RI⁺) / t-PA

のループは正の高い電荷を帯びている。節A及びFで議論した通り、この領域の効果がPAI-1との静電的結合の形成に媒介されているという考えが本発明において提出された。この仮定が試験のために、ループ内の帯電した残基のそれぞれを変え、酵素のPAI-1との相互作用に与えるその変異の効果を上記に従って評価した。ループ中の正に帯電した残基がセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1の相補的領域と塩橋を形成するならば、負に帯電した残基で置換すると、これらの2個のタンパク質の会合の際に同一に帯電した残基が並列するためt-PAとPAI-1の相互作用は崩壊すると予想される。

【0095】特に、節Bに記載した要領で特定部位の突然変異誘発を行い、Lys₂₉₆, Arg₂₉₈又はArg₂₉₉がGly残基により置換されたt-PA変異株をコードするcDNAの構築に使用した。これらの3個の残基のすべてがGlyに置換された、t-PAの3重変異株をコードするcDNAも構築した。さらに2個のcDNAを製造した；ひとつはHis₂₉₇がTyr残基により置換されたt-PA変異株をコードし、他方はPro₃₀₁がGlyにより置換された酵素をコードする。

【0096】これらのt-PA変異株の構築に使用した6種類の突然変異誘発プライマーの配列は以下である：

A (R₂₉₉->E), pSVT7 (RI⁺) / t-PA (R₃₀₁->G)；及びpSTE7 (RI⁺) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E)と称した。

【0099】E. coli株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁109-135 (1985))を上記の変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpSVT7 (RI⁺) / t-PA (K₂₉₆->E) [DH-1], pSVT7 (RI⁺) / t-PA (H₂₉₇->Y) [DH-1], pSVT7 (RI⁺) / t-PA (R₂₉₈->E) [DH-1], pSTE7 (RI⁺) / t-PA (R₂₉₉->E) [DH-1], pSVT7 (RI⁺) / t-PA (R₃₀₁->G) [DH-1]；及びpSTE7 (RI⁺) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E) [DH-1]と称した。正しいアラグメントの存在を、適した放射性突然変異誘発オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成により確認し、アラグメン

トの配向を、適した突然変異誘発オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した制限マッピング及びDNA配列決定により確認した。

【0100】pSVT7 (R17) / t-PA (R₂₉₈→E) [DH-1] ; pSTE7 (R17) / t-PA (R₂₉₉→E) [DH-1] ; 及び pSTE7 (R17) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) [DH-1] を American Type Culture Collection にてそれぞれ ATCC 番号 68157, 68154 及び 68153 として供託した。

【0101】上記プラスミドDNAはその後上記の要領

酵素	
野生型 t-PA	
t-PA (K ₂₉₆ →E)	
t-PA (R ₂₉₇ →Y)	
t-PA (R ₂₉₈ →E)	
t-PA (R ₂₉₉ →E)	
t-PA (P ₃₀₁ →G)	
t-PA (K ₂₉₆ , R ₂₉₈ , R ₂₉₉ →E, E, E)	

上記の表X1の示す通り、上記で議論したいずれの変異も t-PA とその基質との相互作用を変化させなかった。

【0104】同様に図7に示したデータは、変異が t-PA とその正のエフェクターである Des-A-フィブリノーゲンとの相互作用を変えなかったことを示している。逆に図8に示したデータは野生型 t-PA と変異 t-PA のいくつかの基質における明確な差を示している。特に3種類の変異株 t-PA、すなわち t-PA (R₂₉₈→E)、t-PA (R₂₉₉→E) 及び t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) の場合、セルビン、PAI-1 と正常に相互作用する能力が実質的に変化した。特に三重変異株の挙動は顕著である；200倍モル以上過剰の PAI-1 と共に予備的インキュベーションを行った後でさえ活性の損失を示さない。これらの発見は t-PA の表面ループ、すなわち残基 396-302 が特異的に同起原の阻害剤 PAI-1 と相互作用するという提案を支持しており、この相互作用に Arg₂₉₈ 及び Arg₂₉₉ が含まれることを示唆している。これらの観察は t-PA、及び PAI-1 の間の特異的相互作用に静電的結合が含まれるという仮定を満足する。これらの相互作用に含まれる t-PA の残基は Arg₂₉₈, Arg₂₉₉ 及び Arg₃₀₄ である。

【0105】実施例2

PAI-1 変異株

本実施例に記載する方法はセリン・プロテアーゼとして t-PA を、及びセリン・プロテアーゼ・インヒビターとして PAI-1 を使用する場合を対象としているが、

でCOS細胞のトランスアエクシオンに使用した。得られた条件下の増地の希釈液（典型的には1:300）、及び免疫精製酵素の両方を用いて上記の要領でアッセイを行った。

【0102】次に飽和濃度の Des-A-フィブリノーゲン (25 μg/ml) 及び種々の濃度 (0, 0.2-0.16 μM) の基質・Lys-β-ナズミノーゲンの存在下における種々の形態の酵素のアッセイにより野生型、及び変異株 t-PA の K_m 及び K_{cat} 値を決定した。結果を表X1に示す。

【0103】

表X1

K _m (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)
0.024	0.22
0.026	0.22
0.017	0.14
0.027	0.24
0.033	0.26
0.027	0.24
0.027	0.24

上記のようなキネトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼ、及び上記のような他のセリン・プロテアーゼ・インヒビターを、本発明の精神及び範囲内から逸脱することなく本発明の方法を用いて容易に使用することができる。

【0106】A. 鼠破細胞におけるプロインパセ PAI-1 の発現、精製、及びアッセイ

PAI-1 をコードする3.2 kb 及び2.2 kb mRNA から誘導した2種類のcDNAクローン (Ny, T. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **83**, 6776-6780 (1986))、及び Pannekoek, H. 等, EMBO J., **5**, 2539-2544 (1986)) を使用して哺乳類発現ベクター中に全長のcDNAを構築した。第1のクローン、ラムダPAI-1は、ヒトの胎盤性cDNAライブラリからスクリーニングにより得たcDNAの先端を切り取ったバージョンであり (Dr. Carol Mendelson, Center, Department of Biochemistry, Southwestern Medical Center, Dallas, TX より提供) PAI-1 の以下の8アミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドを有する (AVDQLTRD) (Ny, T. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **83**, 6776-6780 (1986))、及び Pannekoek, H. 等, EMBO J., **5**, 2539-2544 (1986))。EcoRI を用いた消化によりこのクローンから放出されるDNAのフラグメントは Ny, T. 等, Proc. Natl.

1. Acad. Sci. USA, 83: 6776-6780 (1986) に報告されている PAI-1 配列のヌクレオチド 147-2013 に対応した。このフラグメントをプラスミドベクター pUC 18 (Yanisch-Perron, C. 等, Gene, 33: 103-119 (1985)) にサブクローニングし、組み換えプラスミド pPAI-1 を得た。このプラスミドからの挿入を、 λ クロノファージ・ラムダ gt11 に構築したヒトの内皮細胞 cDNA ライブラリのスクリーニングに使用した (Huynh, T. 等, DNA Cloning, 1 巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁 49-88 (1985))。このようにして単離した cDNA クローンのひとつ、すなわちラムダ PAI-1-11A は、5' 末端に 2 個の余分なヌクレオチドが存在する以外既知の (Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5: 2539-2544 (1986)) PAI-1 cDNA と同一配列の挿入を持つ。このクローンの 5' 末端、ヌクレオチド 52-1479 から誘導した EcoRI-BglII フラグメントを pPAI-1 の 3' BglII-EcoRI フラグメントに融合させ、pPAI-1-RBR を得た。

【0107】哺乳類細胞における PAI-1 の発現に使用した SV40 スターは以下の要領で構築した。pPAI-1-RBR から放出された EcoRI フラグメントの末端に E. coli DNA ポリメラーゼのクレノウ・フラグメントを挿入し、合成 XbaI リンカーに連結し、プラスミド pSVcat-PA3 中の ϕ -PA3 フラグメントの代わりに挿入し、pSV_L-PAI-1 を得た (Sambrook, J. 等, Mol. Biol. Med., 3: 459-481 (1986))。SV_L-PAI-1 の株を製造し、Doyle, C. 等, J. Cell Biol., 105: 704-714 (1985) に記載の要領で増殖させた。

【0108】以前に Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5: 2539-2544 (1986) 及び Ginsberg, D. 等, J. Clin. Invest., 78: 1673-1680 (1986) に記載された PAI-1 クローンは pPAI-1-RBR によりコードされる配列と同一配列の PAI-1 タンパク質をコードし、SV_L-PAI-1 の構築に pPAI-1-RBR の代わりに使用することができた。

【0109】CV-1 シミア細胞の単層を 37°C で成長させ、SV_L-PAI-1 を注入した。24 時間後、培地を血清を含まないダルベッコの培地 (GIBCO, Inc.) に置換し、さらに 48 時間インキュベーションを続けた。その後分泌された PAI-1 を含む上澄み培地を 0.45 ミクロンのフィルター (Nalge Co.

o.) を通して濾過した。Nonidet P40 (Sigma Chemical Co.)、及び 1.0M のリン酸ナトリウム (pH 7.2) 緩衝液をそれぞれ 0.1% (v/v) 及び 1.0mM の濃度まで加えた。安定化した培養を、2.0mM のリン酸ナトリウム (pH 7.2)、135mM の NaCl、7.0mM の KCl から成る緩衝液 (後文では "PBS") を用いて 1 時間当たり 50 ml の流量で平衡化したコンカナバリン・A-セファローゼ 4B のアフィニティ・カラム (充填容量 1.0 ml) に適用した。カラムを 0.1% (v/v) の Nonidet P40 を含む PBS、2.5 容量、0.1% (v/v) の Nonidet P40、及び 1.0M の NaCl を含む PBS と 5 容量、及び最後に 2.0M のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 1.0 容量で連続的に洗浄した。結合 PAI-1 は 2.0mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中の 0.5M のアルブミン・ブール・D-グルコース (Sigma Chemical Co.) で特異的に溶離した。PAI-1 を含む留分 (上記間接的色素分析法において Calbiochem, Inc. からのウロキナーゼの阻害により分析して) をアッセイした。その後 Nonidet P40 を 0.1% (v/v) の濃度まで加え、アッセイした溶離物 1 ml 当たり 0.57 g の グアニジン・ヒドロクロリド (U. S. Biochemicals) を加えた。このようにして得た部分的精製 PAI-1 を 2.0mM のリン酸ナトリウムから成る緩衝液 (pH 7.2)、及び 1.0% (v/v) のグリセロールに対して透析し、使用まで -80°C にてアロコートとして保存した。

【0110】このようにして製造した PAI-1 は 40 μ g/ml の全タンパク質 (Bio-rad Inc. 販売による Bradford の試験により分析)、及び 12.5% (w/v) の SDS-ポリアクリルアミドゲルの染色により分析して 15 μ g/ml の PAI-1 を含んでいた。ウロキナーゼ (それ自身は ³H-ジイソプロピルアルキルホスフォート (New England Nuclear, Inc. からの NET-065) を用いた測定により活性 52%) に対する測定により、本文の記載に従って製造した PAI-1 の活性は 16-6% であり、活性 PAI-1 の濃度は 4.8 nM であることが明らかになった。

【0111】B-突然変異誘発のための PAI-1 部位の選択

PAI-1 の残基 Glu₄₅₀ 及び Glu₄₅₁ が t-PA と相互作用するという仮定を試験するため、特定オリゴヌクレオチドの突然変異誘発を使用して下表 X11 に示す PAI-1 の 2 種類の変異株を形成した。

【0112】

表 X11

346

355

野生型 PAI-1

EMAPEE11MD

PAI-1 (E₃₅₀→R)

EMAPRE11MD

PAI-1 (E₃₅₁→R)

EMAPER11MD

変異株 PAI-1 (E₃₅₀→R)、及び PAI-1

(E₃₅₁→R) はそれぞれ Glu₃₅₀ 及び Glu₃₅₁ の Arg への置換を含み、負に帯電した Glu 残基を正に帯電した Arg 残基に代え、t-PA (R₃₉₄→E) に存在する負に帯電した Glu 残基との有力な相互作用を促進するために選択的に選んだ。置換が t-PA の残基 Arg₃₉₄ に導入された特異的変異と相補的であれば、Glu₃₅₀ を t-PA (R₃₉₄→E) 変異株などとの相互作用が強化された PAI-1 を形成する他のいろいろな置換基に、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく置換することができた。

【0113】C. PAI-1 の発現及び遺伝子マッピング-突然変異誘発

第1に、マチオニル-PAI-1 を直接発現し、1 方では発現ベクターからのシグナル配列及び cDNA の 5' 非翻訳領域を除去するための、プラスミド pPAIST7 と称する PAI-1 発現プラスミドの構築が必要であった。この達成のため、合成 DNA リンカーを使用して PAI-1 コード配列の両末端の再構築、及び成熟 PAI-1 の第1残基をコードするトリプレットの直前に ATT タンパク質合成開始コードの導入を行った。さらにプラスミド pBR322 への cDNA コード領域の挿入を容易にするため、PAI-1 cDNA フラグメントのそれぞれ 5' 及び 3' 末端に、EcoRI 及び HindIII 制限エンジマレセ認識部位を形成するリンカーを設計した。

【0114】特に ApaLI 及び PstI MD を用いて pPAI-1-RBK を消化することによりプラスミド pPAIST7 を得た。得られた PAI-1 の残基1のための2bpのコロニー、及び379残基タリク質の残基2-376のための全コード配列を含む1127bp フラグメントをゲル電気泳動により精製した。次に合成リンカー (5' 末端にて10bp、及び3' 末端にて13bp) を1127bp ApaLI、及び PstI MD DNA フラグメントと連結し、EcoRI 及び HindIII を用いて消化し、1146bp EcoRI-及び HindIII-消化 DNA フラグメントをゲル電気泳動により分離した。その後このフラグメントを EcoRI-及び HindIII-消化 pBR322 にクローニングした。

【0115】発現プラスミドの構築の開始のために、サブクローンを EcoRI で消化し、直鎖プラスミドを細菌のアルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化した。その後 trp プロモーター、及びリボソーム結合部位を含む pC5A-48 からの 360bp EcoRI

DNA フラグメント (Frankel, A. 等, *Meth. Enzymol.*, 162: 653-668 (1988)) を用いて、二フラグメントを連結することにより PAI-1 発現プラスミドを構築した。次に、得られたプラスミドを用い、Maniatis, I. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1版, Cold Spring Harbor (1982) に記載の要領で *E. coli* の質転換を行った。得られた質転換物のプラスミド DNA を HindIII を用いた制限分析により trp プロモーターフラグメントの存在、及び配向に関してスクリーニングを行った。多くの質転換物の trp プロモーターに隣接して阻害剤の直接的発現に必要な立体配置で PAI-1 遺伝子を持つプラスミドを含むと同定された。それらのプラスミドのいくつかを pPAIST7 と称した。

【0116】アミノ酸残基 Val₁₂₄₄ から Pro₃₇₉ までをコードする PAI-1 のヌクレオチド配列を含むプラスミド pPAIST7 の SalI-HindIII フラグメントを SalI-HindIII 消化複製型 M13 mp18 (図9を参照) に連結した。連結 DNA を *E. coli* 株 TG-1 にトランスフェクトした。組み替えが成功したベクターにより生成された白色コロニーを採取し、適した290塩基対 SalI-HindIII フラグメントの存在をサザナグハイブリッド形成、制限酵素消化、及び cDNA 配列決定により確認した。

【0117】290塩基対 SalI-HindIII フラグメントにおける変異を t-PA についての上記に記載の変種であるホスホリル化合成突然変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーを用いて導入した (図9を参照)。これらの PAI-1 変異株の構築に使用した3個の突然変異誘発プライマーの配列は以下である：

PAI-1(E₃₅₀→R): 5' TGATGATCTCTCGGGC 3'

PAI-1(E₃₅₁→R): 5' CCAATGATGATCTCTCGGGC 3'

得られた PAI-1 DNA の変異株 SalI-HindIII フラグメントの配列を完全に決定した。立証された変異株の DNA の二重鎖複製型を単離し、変異290塩基対 SalI-HindIII フラグメントを SalI-HindIII 消化、及び6.0% (w/v) の非変性ポリアクリルアミドゲルを通した電気泳動により単離した。下記に詳細に記載する通り、変異を含むこれらのフラグメントを使用し、問題の PAI-1 変異株をコードする PAI-1 cDNA のバージョンを再構築した。

【0118】D. 変異株 PAI-1 のための発現ベクタ

ーの構築

プラスミド pPAIST7HS (ヌクレオチド対1におけるHindIII部位、及びヌクレオチド対2106におけるSalI部位の欠落したプラスミドpPAIST7の誘導体であり、PAI-1 cDNAコード配列における変異SalIのHindIIIフラグメントへの交換を容易にするために構築された) におけるPAI-1の変異体を以下の要領で構築した。

PAI-1 cDNAの中心290塩基対のSalIからHindIIIまでのフラグメントを、SalI及びHindIIIを用いた消化、及び1.0% (w/v) アグロースゲル電気泳動によりプラスミドpPAIST7HSから除去した。その後、キラーDNAが残留直鎖フラグメントを特定オリゴヌクレオチドの突然変異誘発で製造した上記の290塩基対SalIからHindIIIフラグメントの変異体カセットに連結した(図9を参照)。得られたプラスミドをpPAIST7HS (E₃₅₀→R) 及びpPAIST7HS (E₃₅₁→R) と称した。

【0119】E. coli株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 1989-1985) を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [DH-1]、pPAIST7HS (E₃₅₀→R) [DH-1]、及びpPAIST7HS (E₃₅₁→R) [DH-1] と称した。E. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England, 1984) を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [TG-1]、pPAIST7HS (E₃₅₀→R) [TG-1]、及びpPAIST7HS (E₃₅₁→R) [TG-1] と称した。正しいフラグメントの存在を適した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドのハイブリッド形成、及び核酸配列決定により確認した。

pPAIST7HS (E₃₅₀→R) [DH-1]、及びpPAIST7HS (E₃₅₁→R) [DH-1] をAmerican Type Culture CollectionにてそれぞれATCC番号68155及び68156として供託した。

【0120】E. 野生型、及び変異株PAI-1の発現、抽出、及びアッセイ

E. coli株pPAIST7HS [TG-1]、pPAIST7HS (E₃₅₀→R) [TG-1]、及びpPAIST7HS (E₃₅₁→R) [TG-1] を、リアー・バルタニ・ブイオン中で37℃にて飽和濃度まで終夜成育した。50μlの培養物を使用して、1リットル当たり6.0gのNa₂HPO₄、3.0gのKH₂PO₄、0.5gのNaCl、0.5gのMgSO₄・7H

2O、1.0gのNH₄Cl、5.0gのカサミノ酸、10.0gのグルコース、10.0mlのグリセロール、1.0mgのチアミン・HCl、及び2.5mgのアミノ酸を含む修正M9培地(pH7.4)50mlに接種した。250mlのアーレン・メイヤー・フラマ中、37℃にて培養細胞を22時間成育した。抽出細胞を以下の要領で培養物から得た。

【0121】E. coliを遠心によりペレット化し、20mlの冷50mMトリス・HCl (pH8.0)、及び1.0mMのEDTA中で遠心により洗浄し、氷上の3.6mlの同緩衝液中に再懸濁した。1ml当たり10mgトリチウム0.4mlを添加して20分間、0.1mlの10% (v/v) Nonidet P-40を添加して10分間、及び0.2mlの5.0M NaClを添加して10分間細胞を行なった。超音器(Sonifluid)細胞切断器のマイクロチップを50%使用サイズに、及び設定7 (Branson Sonic Power Company) で使用して細胞を短く切断し、粘度を下げ、4℃にて30分間15,000xgの遠心を行った。透明な溶液体に10% (v/v) までグリセロールを加え、PAI-1を含む抽出物を使用まで-80℃にてアリコートとして保存した。

【0122】哺乳類細胞に発現したPAI-1に関して上記に記載した要領でウロキナーゼを用いて24℃にて3時間インキュベートすることにより、抽出物を活性PAI-1に関して高定した。野生型PAI-1、PAI-1 (E₃₅₀→R)、及びPAI-1 (E₃₅₁→R) の抽出物はそれぞれ803nM、593nM、及び162nMの活性PAI-1を含んでいた。

【0123】野生型、及び変異株t-PAと野生型、及び変異株PAI-1の相互作用の速度に関する速度論的決定を、0.1mMのEDTA及び0.1% (v/v) のツイン20を含む0.1Mトリス・HCl緩衝液(pH7.4)中、24℃にて行った。上記のt-PAに関する間接的色差分析法を用いて残留酵素活性を時間の関数として決定した。t-PAに対して過剰のPAI-1の偽一次条件下で、時間に対する残留t-PA活性の直線状対数プロットの傾きから各阻害剤濃度に関する減期(t_{1/2})を決定した。見掛けの速度定数(k_{app}=0.693/t_{1/2})を阻害剤濃度で割って速度定数、k₁を算出した。

【0124】60pMのt-PAの阻害の速度を、偽一次条件下で0.6-100nMの範囲の阻害剤濃度にて研究した。t-PA-PAI-1混合物をマイクロタイタープレートウェル中、24℃にて種々の時間(0-30分)予備的にインキュベートし、その後Lys-ブラスミン・ゲル、スバクトロザイム・PLI、及びDes-A-アミノカプラーゼをそれぞれ最終濃度300nM、0.4nM及び12.5μg/mlまで添加した。基質の添加後、マイクロタイタープレートを37℃にて

インキュベートし、405 nmにおける吸収を2次間追跡して残留t-PA活性を決定した。

【0125】野生型、及び変異株PAI-1による野生

型、及び変異株t-PAの阻害の最高速度定数 ($M^{-1}s^{-1}$) を下表X111に示す。

【0126】

表X111

	野生型	t-PA	t-PA
	t-PA	(R ₃₀₄ →S)	(R ₃₀₄ →E)
野生型 PAI-1	1×10^6	3×10^5	1×10^4
PAI-1			
(E ₃₅₀ →R)	1×10^6	1×10^6	1×10^6
PAI-1			
(E ₃₅₁ →R)	3×10^5	1×10^5	1×10^5

上記の表X111に示す通り、PAI-1 (E₃₅₀→R) 及びPAI-1 (E₃₅₁→R) の両方とも、野生型PAI-1と比較して、t-PA (R₃₀₄→E) との相互作用の速度定数が増加しており、変異によりセリン-プロテアーゼインヒビター抵抗性t-PA (R₃₀₄→E) の阻害に関するPAI-1の能力が復活したことを証明している。本発明を特別な具体化を参照して詳細に説明したが、種々の変異及び修正は本発明の精神、及び範囲から逸脱することなく可能であることが同業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】キモトリプシン-スーパーファミリーの種々のセリン-プロテアーゼの配列の比較を示す。配列は、保持されたアミノ酸の重複が示されるように並べた。トリプシン上の数字はプロテイン-データバンクのPDB 3ptp, ent キモトリプシンで使用されている番号付による。t-PA上の数字は成熟t-PA分子におけるアミノ酸による。

【図2】セリン-プロテアーゼインヒビターのセルビン-ファミリーの種々のメンバーの配列の比較を示す。配列は保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。アルファ-1-ア-チトリプシン下の数字、及びPAI-1上の数字は成熟分子におけるアミノ酸残基による。

【図3】セリン-プロテアーゼインヒビターのセルビン-ファミリーの種々のメンバーの配列の比較を示す。配列は保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。アルファ-1-ア-チトリプシン下の数字、及びPAI-1上の数字は成熟分子におけるアミノ酸残基による。

【図4】野生型t-PA、及び本発明のt-PAのセルビン抵抗性変異株の変異、及び発現に用いられたベク

ターの構築を図示したものである。

【図5】野生型t-PA及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性の間接的色素澱粉法における比較を示す。図5で■は野生型t-PAを示し、○はt-PA (R₃₀₄→S)を示し、□はt-PA (R₃₀₄→E)を示し、+はt-PA (De₁₂₉₆₋₃₀₂)を示す。

【図6】間接的色素澱粉法による野生型t-PA、及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性に対するPAI-1の効果を示す。図6において、■は野生型t-PAを示し、○はt-PA (R₃₀₄→S)を示し、□はt-PA (R₃₀₄→E)を示し、+はt-PA (De₁₂₉₆₋₃₀₂)を示す。

【図7】間接的色素澱粉法による野生型t-PA、及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性の比較を示す。図7において、□はt-PA (H₂₉₇→Y)を示し、+は野生型t-PAを示し、+はt-PA (K₂₉₆→E)を示し、■は三重変異株t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E)を示し、▲はt-PA (R₂₉₉→E)を示し、△はt-PA (R₂₉₈→E)を示し、○はt-PA (P₃₀₁→G)を示す。

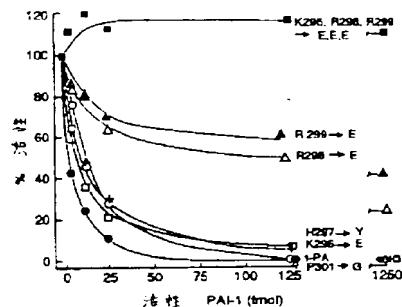
【図8】間接的色素澱粉法による野生型t-PA、及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性に対するPAI-1の効果を示す。図8において、□はt-PA (H₂₉₇→Y)を示し、+は野生型t-PAを示し、+はt-PA (K₂₉₆→E)を示し、■はt-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E)を示し、▲はt-PA (R₂₉₉→E)を示し、△はt-PA (R₂₉₈→E)を示し、○はt-PA (P₃₀₁→G)を示す。

【図9】野生型PAI-1、及び本発明のPAI-1の変異株の変異、及び発現に使用したベクターの構築を図示したものである。

【図1】

	1E	39	50
トリプシン	IVGGYTCCAN	TVPYQVSLNSGYH FCGGSLINSQ
		296	302
TPA LT. 金鎖	IKGGFLADIA	SRPWQAIFA	KHRRSPGERF LCGGILISSC
ウロキナーゼ	IGGEFTTIEN	Q.PWFAAIYR	RHRGGS.VTY VCGGSLMSFC
プラスミン	VVGGCVARPH	SWPWQVSLRTRFGMH FCGGTLISPE
プロテイン C	DQEDQVDFRL	IDGKMTRAGD	S.PWQVLLDSKTKL ACGAVLIHFS
トロンビン	IVEGQDAEVG	LSPWQVMLFRKSPQEL LCGASLISDR
	57		
トリプシン	WVSAABCYK	S.....GIQV	RLGEDNINVV EG.NEQFISA SKSIHV....
	322		350
TPA LT. 金鎖	WILSAABCFQ	ERFFPHHLTV	ILGR.TYRVV PGEEEQKFEV EKYIVHK...
ウロキナーゼ	WVISAIECFI	DYPKKEDYIV	YLGR.SRLNS NTQGEKFEV ENLILHK...
プラスミン	WVLTAAACLE	KSPRFSSYKV	ILGA.HQEVN LEPRVQIEIV SRLFL.....
プロテイン C	WVLTAAACHD	ESKGL.....V	RLGEYDLRRW EKWEL.DLDI KEVTVH....
トロンビン	WVLTAAACLL	YPPWDK....N	FTVDDLLVRI GKHSRTYER KVEKISMCDK
	102		
トリプシンPSYNS	NTLNNDIMLI	KLKSA..... ASLNSRVASI SLPTSCASAG
		371	400
TPA LT. 金鎖EFDD	DTYDNDIALL	QLKSDSSRCA QESSV.VRTV CLPFPADLQLP
ウロキナーゼDYSAST	LAEHNDIALL	KIRSKEGRCA QPSRT.IQTI CLPSPMYNDPQ
プラスミンEPTKNDIALL	KLSSP.....	AVITDKVIPA CLPSPNYVVA
プロテイン CPNYSK	STTDNDIALL	HLAQF..... ATLSQITVFI CLPDSGLAER
トロンビン	IYIHPRYNWK	ENLDRDIALL	KLKRP..... IELSDYIHPV CLPDKQTAAM
		150	
トリプシンTQCL	ISGWGNTKSS	GT.SYPOVLK CLKAPILSDS SCKSAYPGQ.
TPA LT. 金鎖	DW.....TECE	LSCYGGHEAL	SP.FYSERLK EAHVRLYPSS RCTSOHLINR
ウロキナーゼ	FG.....TSCE	ITGFGKENST	DY.LYFEQLK MTUVKLISR ECQOPHYYS
プラスミン	DR.....TECF	ITGWTGTQGT	...FGAGLLK EAQLPVIENK VCNRYEFLNG
プロテイン C	ELNQAGQETL	VTGWGYHSSR	E.KKAKRNR FVLNFIKIPV VPMNECSEVM
トロンビン	LLH.AGFKGR	VTGWGNRRET	WTISVAEVOF SVLQVNLPL VERPVCKAST
		195	200
トリプシン	...ITSNMFC	AGYL.EGG..	...KDSQCGD SGGPVVCS... ..GKLGGI
	450		478
TPA LT. 金鎖	T...VIDNMLC	AGDTRSGGPQ	ANLHDACQGD SGGPLVCLND ..GRMTLVGI
ウロキナーゼ	E...VITKMLC	AAD.....PQ	..WKTDSQCGD SGGPLVCSLQ ..GRMTLTGI
プラスミン	R...VQSTELC	AGHL.....	..ATDSQCGD SGGPLVCFEK ..DKYILQSV
プロテイン C	SNMVSENMFC	AGIL.....	GDRQDACEGD SGGPMVASEF ..GTWFLVGL
トロンビン	RIRITDNMFC	AGYK...PGE	GKRGDACEGD SGGPFVHKSP YNNRWYQMSI
	214		245
トリプシン	VSWGSGCAQK	NKPGVYTKVC	NYVSWIKQTI ASN..... ..
	500		527
TPA LT. 金鎖	ISWGLGCGOK	DVPGVYTKVT	NYLDNIRDNM RP..... ..
ウロキナーゼ	VSWGRCALK	DKPGVYTRVS	HELPIRISHT KEENGLAL... ..
プラスミン	TSWGLGCRAP	NKPGVYTRVS	REVTWIEGVM RNN..... ..
プロテイン C	VSWGEGCGLL	BNYGVYTKVS	RYLDNWHGHI RDKEAPQKSW AP
トロンビン	VSWGEGCDRD	GKYGFTYHVF	RLKKWIQKVI DRLGS..... ..

【図8】



PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhhibitor

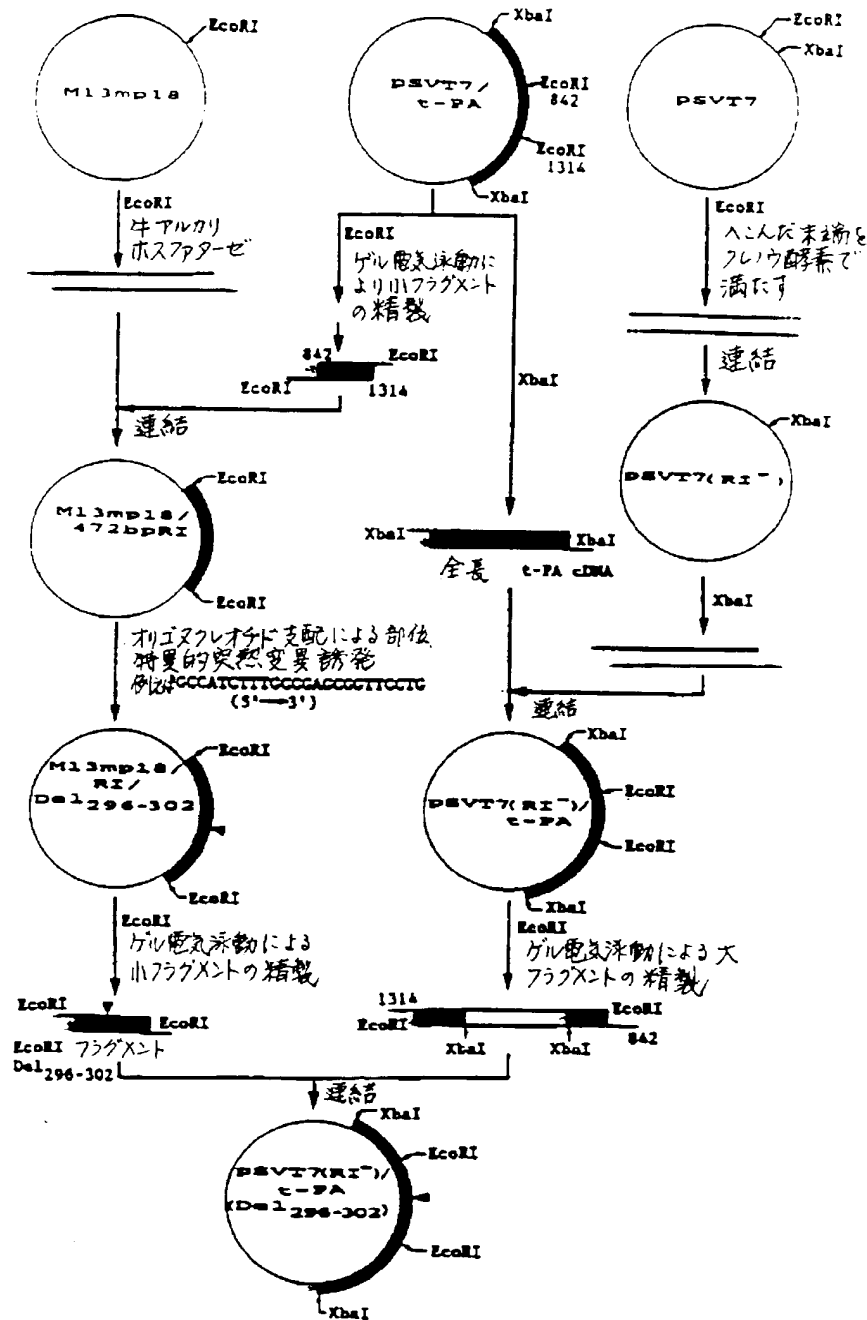
150
PAI-1 NLLGKCAVDQ LTLVLVNL YFNGQWTFP FDESTERRLF HKSDGSTVSV
Antitrypsin DLV..KELDR DTVFALVNYI FFKGEMERPF EVKDEERDF NVDOVTTVKV
200
PAI-2 PEGSVGDGTR MVLVNAVYFR GKWETPFERR LKGLYFFRVN SAQRTFVCHM
A-chymotryp DLI..KDFDS QTMNVLVNYI FFKAKWENPF DPQDTHQSRF YLSKRWVNV
A2-antiplas EFLS..GLPE DTVLLLLNAI HFQGFWRNKF DPDLTQRDSF HLDEQFTVPV
A-thrombIII DVIPSEAINF LTVLVLVNTI YFKGLWKSFP SPKNTREKLF YKADGESCSA
HeparinCoII DALE..NIDF ATQMILNCI YFKGEMVNFY FVENTENMF ALNEREVVKV
Clinhhibitor RLDD..SLPS DTLVLVLLNAI YLSAKWRTTF DPKRTREFF HFKNSEVVKV

200
PAI-1 PMMAQTNKFN YTEFTTPDGH YYDILELPHY GDTLSEFIAA FYERE..VFL
Antitrypsin PMMERLGMFN IQEC.KRLSS W..VLLKYL GNAMAIFFLP DEGR.....L
250
PAI-2 YLAEKLNIGY IEDLEAQ... ILELPHYAGDV SMFLLLPDEI ADVSTGLELL
A-chymotryp PMNSLHLLTI PFYRDEELSC ..TVVELRYT GNABALFILP DQDK.....M
A2-antiplas EMHQARTYFL RWFLLQCFEI ..QVAFYFFK NNMSPVVLVP TH.....FEW
A-thrombIII SMHYQEGFR YRR..VAEGT ..QVLELFFK GDDITHVLIL PK.....PEK
HeparinCoII SMNQTGNFL AANDQELDCD ...ILQLEYV GGISMILVVP RRM....SGM
Clinhhibitor MMNSKRYFVA HFIDQTLKAR .VGQLQL...S BNLSLVILVP ONLK...HRL

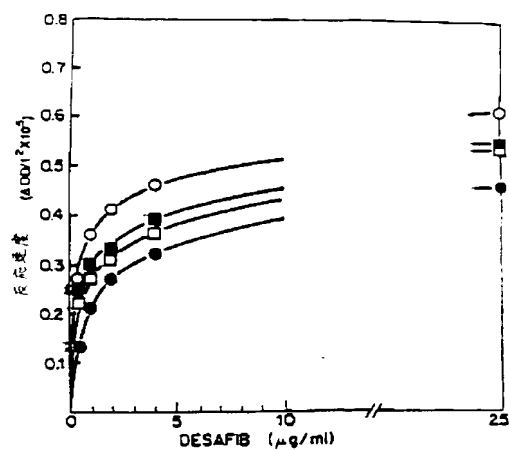
250
PAI-1 SALTNLSAQ LISHWKGNMT ..RLPRLVLV PFPSLETEVD LR.KPLENLG
Antitrypsin QMLENELTHD IITRFLENED ..RKSASLEL FKLSITGTVD LR.SVLGQLG
300
PAI-2 ESEITYDKLN KWTSEKDMAR DEVEYIYQPF KLEENYELA. SILRSHMGED
A-chymotryp ZEVEAHLLPE TLKWRDSELE F.REIGELYL PFPSISRDYN LN.DILLQLG
A2-antiplas NVSOVLAMLS WDTLEPPLVW ..KRPTEVRL PFYLYNQMD LV.ATLSQLG
A-thrombIII SLAKVEKELT PEVLQENLDE LSEKRLVVM PFRIEDGFS LR.EQLQDMG
HeparinCoII KTLAQLTFR VVERWQESMT ..NRTRVLL PFPEKEMYN LV.EELKLMG
Clinhhibitor EDMEQALSFS VFKAIRKLE KSKPQPTLLT LPRIKVTTSQ DMLSIKLEL

300
PAI-1 HTDMFRQ... FQADFTLSB QEPLEVAQAL QVRIEVNES GTVASEST..
Antitrypsin ITRVFN... .GADLSGVTE KAPLELSKAV KAVLTIDER GTEAAGAR..
350
PAI-2 AFNE...GRA NPSGHSERND LPLEEVFQA NYDVNEEGTE AAAGTCGV..
A-chymotryp IEAFTS... .KADLSGITC AMNLAVSQVY EKVSVDVFE GTEASAT..
A2-antiplas LQELPQA... .PDLEGISX Q.SLVVSGVQ HOSTLELSV GVEAAAAT..
A-thrombIII LVDLPSEKRS KPGIVAEGR D.DLYVSDAF KAPLEVNEE GSEAAAAT..
HeparinCoII IRLFPD... .KMGHMAGIS DORIAIDLFE HOGTITVNEE GTOATTVT..
Clinhhibitor PFDPSYD... .LNLGCLTE DFDLQVSAHQ HQTVLKLTET GVEAAAAS..
350
PAI-1 AVIVEARMAP EE....IIND RFPLPVVREN PTGTVLPMGQ VNEP.....
Antitrypsin FLEAIFNEIF FE....VRFN KFFVFLMIEQ NTRSPFLMGR VVNPTQK..
PAI-2 ...HTGRTGH GGPQ..FVAD RFPLFLIMK ITRCILPFR PCSF.....
A-chymotryp AVKITLLSAL VETETIVAFM RFPLNIIVPT DTQNIFFNKK VTHP.SKPRA
A2-antiplas .SIAMERHSL SS....FSVM RFPLFFIFED TTGLPLVGS VRNPNFSAPR
A-thrombIII AVVIAGRSLM PNAVT..FKAN RFPLVFIREV PLNTIIFMGR VANPCVK..
HeparinCoII TVGPRFLSTQ VR....PTVD RFPLFLIYER RTSCLLFMGR VANFSRS..
Clinhhibitor .AISVARTLL V.....FEVQ QFFLPVLWDQ QKFPVVFNGR VYDFRA..
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas CIZQWGSQ..
A-thrombIII ELKQQQSSFG NEDFLQSLKG YPRGDKLPQ DLKLVFPNEE DYPQFCSPK
HeparinCoII
Clinhhibitor

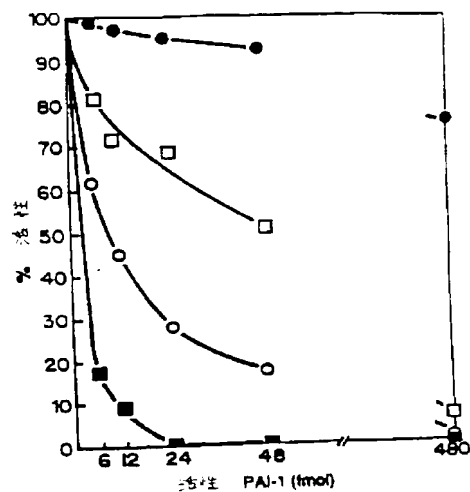
【図4】



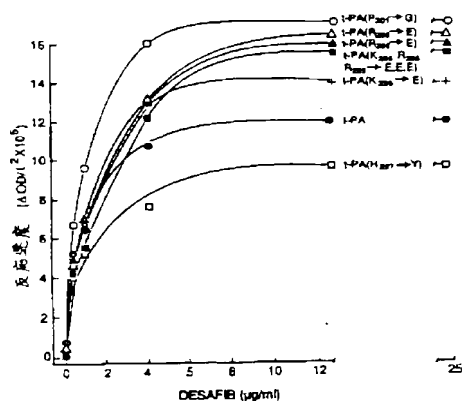
【図5】



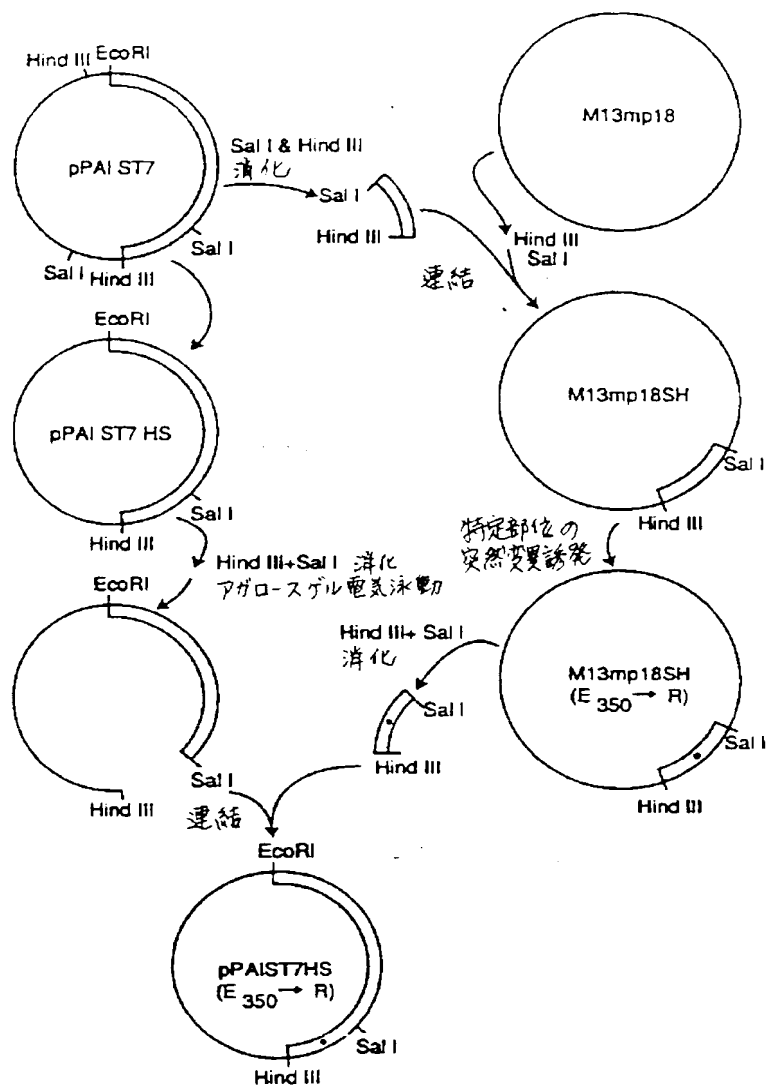
【図6】



【図7】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

(C 1 2 N 9 '64

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

シーマコード (参考)

(72) 発明者 エドウィン・エル・マジンソン
アメリカ合衆国テキサス州75209ダラス・
アパートメント202・ボルドードライブ
6203
(72) 発明者 エリザベス・ジェイ・ゴールドスミス
アメリカ合衆国テキサス州75209ダラス・
チエロキートレイル4626

(72) 発明者 マリイージェイン・エイチ・ゲシング
アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・
アービンシモンズドライブ4320
(72) 発明者 ロバート・デイ・ジェラード
アメリカ合衆国テキサス州75252ダラス・
フエザーウッドドライブ18620